

Aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie an der Universitätsmedizin Rostock  
– Arbeitsgruppenleiterin: Prof. Dr. B. Nebe –

Die Rolle des Aktinzytoskeletts bei der funktionellen Steuerung  
humaner mesenchymaler Stammzellen nach mechanischer Belastung  
der  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  Integrinuntereinheiten

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Elisabeth Marie Nissen

2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Rychly  
Arbeitsbereich Zellbiologie Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Gustav Steinhoff  
Klinik für Herzchirurgie Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Georg Duda  
Julius-Wolff-Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration  
Charité/Universitätsmedizin Berlin

Einreichungsdatum: 26.04.2016

Verteidigungsdatum: 25.04.2017



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND HINTERGRUND .....</b>	<b>1</b>
1.1	MESENCHYMALE STAMMZELLEN.....	1
1.1.1	Vorkommen, Nachweis, Isolation .....	1
1.1.2	Charakterisierung .....	2
1.1.3	Stammzellnische.....	2
1.1.4	Therapeutische Einsatzmöglichkeiten .....	3
1.2	ZYTOSKELETT .....	4
1.2.1	Modulatoren des Aktinzytoskeletts .....	6
1.3	INTEGRINE, MECHANOTRANSDUKTION .....	7
<b>2</b>	<b>FRAGE- UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
3.1	MATERIALIEN .....	11
3.2	GERÄTE.....	11
3.3	SOFTWARE .....	11
3.4	CHEMIKALIEN .....	12
3.5	ANTIKÖRPER.....	12
3.6	KITS .....	13
3.7	METHODEN .....	14
3.7.1	Zellgewinnung.....	14
3.7.2	Bestimmung der Zellzahl .....	14
3.7.3	Mechanische Reizung der Integrinuntereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ .....	15
3.7.4	Durchlichtmikroskopie.....	17
3.7.5	Immunfluoreszenz .....	17
3.7.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	17
3.7.7	Zelllyse.....	18
3.7.8	Proteinbestimmung.....	18
3.7.9	Gelelektrophorese .....	18
3.7.10	Western-Blot .....	18
3.7.11	BioPlex Array Reader .....	19
3.7.12	Durchflusszytometrie BD FACS Calibur® Flow Cytometer .....	20
3.7.13	Statistik und Auswertung .....	21
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>22</b>

4.1	MORPHOLOGIE DER MSC UNTER MODULATOREN DES AKTINZYTOSKELETTS .....	22
4.2	IMMUNFLUORESCENZ-DARSTELLUNG VON $\beta 1$ UND $\alpha 5$ INTEGRINUNTEREINHEITEN UND VON AKTIN UNTER DEM EINFLUSS VON MODULATOREN DES AKTINZYTOSKELETTS.....	24
4.3	AKTIVIERUNG VON SIGNALPROTEINEN NACH REIZ AN DEN INTEGRINUNTEREINHEITEN $\beta 1$ UND $\alpha 5$ .....	26
4.3.1	<i>Aktivierung von Erk und Akt.....</i>	26
4.3.2	<i>Expression von NF<math>\kappa</math>B, I<math>\kappa</math>B und STAT2 nach Mechanotransduktion über die Integrinuntereinheiten <math>\beta 1</math> und <math>\alpha 5</math>.....</i>	30
4.4	AKTIVIERUNG VON SIGNALPROTEINEN NACH REIZ AN DEN INTEGRINUNTEREINHEITEN $\beta 1$ UND $\alpha 5$ UNTER DEM EINFLUSS VON MODULATOREN DES AKTINZYTOSKELETTS .....	32
4.4.1	<i>Aktivierung von Erk und Akt.....</i>	32
4.4.2	<i>Aktivierung von Src Tyrosin Kinasen .....</i>	37
4.5	EXPRESSION VON KOLLAGEN TYP 1 ALS FUNKTIONELLE ANTWORT NACH MECHANISCHER BELASTUNG AN DEN INTEGRINUNTEREINHEITEN $\beta 1$ UND $\alpha 5$ UNTER MODULATOREN DES AKTINZYTOSKELETTS .....	42
4.6	ZELLZYKLUSANALYSE UNTER MODULATOREN DES AKTINZYTOSKELETTS .....	44
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>57</b>

### 1 Einleitung und Hintergrund

#### 1.1 Mesenchymale Stammzellen

Die Entstehung embryonaler, mesenchymaler Gewebe sowie die Heilung adulter Gewebe sind durch mesengenetische Prozesse möglich, in denen embryonale, bzw. adulte, so genannte mesenchymale Stammzellen über mehrere Schritte in verschiedene Zellreihen differenzieren und die verschiedenen Zellen, bzw. Gewebe bilden. Die Interaktion von extrinsischen und intrinsischen Faktoren kontrolliert und charakterisiert die Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) (Caplan 1991, 1994).

##### 1.1.1 Vorkommen, Nachweis, Isolation

Mesenchymale Stammzellen können aus vielen Geweben isoliert werden, am häufigsten praktiziert wird es jedoch aus dem Knochenmark, in dem sie eine wichtige zelluläre Komponente der Mikroumgebung bilden (Pittenger 2008; Majumdar et al. 1998).

Des Weiteren kann die Isolation von MSC aus der Skelettmuskulatur (Williams et al. 1999) und aus Nabelschnurblut (Wang et al. 2005) vorgenommen werden, in welchem die MSC ähnliche Charakteristika aufweisen wie die MSC des Knochenmarks (Wang et al. 2005). Ferner können MSC aus der Pulpa von Milchzähnen (Kerkis & Caplan 2012), aus der Lunge (Barkauskas et al. 2013) und aus dem Endometrium isoliert werden (Wang et al. 2013), sowie in schneller und effizienter Methode aus dem Fettgewebe (Zuk et al. 2002; Zeng et al. 2013). Ein Vergleich von MSC aus dem Fettgewebe mit MSC aus dem Knochenmark zeigt, dass sich die Zellen ähneln hinsichtlich der Proliferationsrate, der Klonogenität und des Differenzierungspotentials. Unterschiede zwischen ihnen bestehen jedoch hinsichtlich der Expression und Sekretion verschiedener Faktoren (Dmitrieva et al. 2012).

Nach Isolation und Aufnahme in Kultur werden bei MSC unter anderem Wachstum, Differenzierungspotential und die Expression von Oberflächenmarkern durch die Kultivierungsbedingungen beeinflusst. Großen Einfluss haben die Zusammensetzung der Nährmedien und das eingesetzte Serum (Pieri et al. 2011; Hagmann et al. 2013). Für die bestmögliche Kultivierung der MSC wird zudem versucht serumfreie Nährmedien zu entwickeln. Durch diese sollen die MSC ihren Stammzellcharakter beibehalten, ein schnelleres Zellwachstum besitzen, eine Upregulation mehrerer für die

Funktion der MSC wichtiger Gene sowie eine Downregulation des proinflammatorischen Cytokines IL-6 zeigen (Crapnell et al. 2013).

### 1.1.2 Charakterisierung

Die International Society for Cellular Therapy (ISCT) hat 2006 drei Minimalkriterien zur Charakterisierung von MSC aufgestellt:

- 1: Unter Standard-Kulturbedingungen müssen die MSC Plastik-adhärenz sein.
- 2: MSC müssen CD105, CD73 und CD90 als Oberflächenmarker exprimieren und keine Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR aufweisen.
- 3: MSC müssen die Fähigkeit haben in vitro in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren (Dominici et al. 2006).

In vitro zeigt sich, dass nach einer größeren Anzahl an Zellpassagen die MSC ihren Stammzellcharakter verlieren. Ab der 6. Passage sinkt das Differenzierungspotential der Zellen. Das stellt ein Problem in der Therapie mit diesen Zellen dar, weil für die klinische Anwendung eine hohe Zellzahl erforderlich ist, Zellen mit hoher Proliferationsrate und hohem Differenzierungspotential jedoch in frühen Passagen zu erwarten sind (Bonab et al. 2006; Guercio et al. 2013).

### 1.1.3 Stammzellnische

Spezielle anatomische Orte bilden als die sogenannten Nischen eine Mikroumgebung, welche für die Regulation der Gewebekonstruktion, Aufrechterhaltung und Regeneration der MSC notwendig sind. Biochemische intrinsische und extrinsische Signale und die mechanische Interaktion der MSC mit ihrer Nische und der Extrazellulärmatrix erzeugen eine ausgewogene dynamische zelluläre Antwort auf die Bedürfnisse des Organismus (Watt & Hogan 2000; Scadden 2006; Discher et al. 2009; Guilak et al. 2009; Hsu & Fuchs 2012).

Die Nischen befinden sich im Knochenmark, sowie vermutlich im gesamten Organismus perivaskulär gelegen (da Silva Meirelles et al. 2008).

In den Nischen sind die Stammzellen wachstumsinhibiert. Die intrinsische Inhibition erfolgt, ohne dass die MSC in ihren Eigenschaften und Genexpressionen verändert werden (Tumbar et al. 2004; Blanpain et al. 2004).

Die dynamische Interaktion von extrinsischen Faktoren der Mikroumgebung mit den MSC ermöglicht eine Verbindung zwischen den verschiedenen Systemen des Körpers

wie dem Gefäß- und Immunsystem (Fuchs & Chen 2013; da Silva Meirelles et al. 2008).

### 1.1.4 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten

Bereits 1994 (Bruder et al. 1994) hat man sich von der Kenntnis über die genauen, bei der Proliferation der MSC ablaufenden zellulären und molekularen Vorgänge eine neue Technologie der Zelltherapie erhofft. Die ossäre Wirkung stand im Vordergrund. Die lokale Applikation zur Heilung von Knochendefekten und die systemische Applikation von Stammzellen oder deren Regulatorproteinen bei Osteoporose stellten Zukunftsvisionen dar.

Heute ist aktueller Bestandteil der Forschung, spezielle Proteine in die Zelloberfläche der MSC einzugliedern, um die MSC mit bestimmten Zielgeweben zu verbinden und somit zielgerichtet die körpereigenen Heilungsprozesse bestmöglich zu unterstützen (Caplan 2005). Die dadurch erhöhte Zielgenauigkeit der MSC ermöglicht eine Verminderung der effektiven therapeutischen Dosis (Kean et al. 2013).

Durch den Einbau von verschiedenen Genen in die MSC ist eine genetische Veränderung möglich, ohne dass die Zellen ihre Eigenschaften als Stammzelle verlieren (Bartholomew et al. 2001; Caplan 2000).

#### 1.1.4.1 Differenzierungspotential

Durch Knochenmarkaspiration gewonnene MSC zeigen einen fibroblastenähnlichen Phänotyp und wachsen im Monolayer. Durch Induktion können die MSC in verschiedene Zellreihen differenzieren wie in die adipöse, chondrogene oder osteogene Zellreihe und somit zu Knochen-, Knorpel-, Fett-, Sehnen-, (Herz-) Muskel- und Markzellen differenzieren (Pittenger et al. 1999; Dennis & Caplan 1996; Toma et al. 2002; Mackay et al. 1998).

Die Induktion der Differenzierung in vitro erfolgt über eine Kultivierung mit entsprechenden Wachstumsfaktoren (Naumann et al. 2002). Für die Heilung in vivo sind Veränderungen der Matrix-Umgebung der MSC durch physikalische Kräfte und selektive humorale Signale entscheidend (Pittenger et al. 2002; Bai et al. 2007).

#### 1.1.4.2 Geweberegeneration

Entscheidend für eine erfolgreiche Geweberegeneration ist der Erhalt einer regenerativen Mikroumgebung, wozu eine Suppression der lokalen Immunantwort und der Apoptose, sowie die Induktion der Angiogenese, der Mitose und des Repair-Systems notwendig sind. Die MSC ermöglichen dies über die Sekretion von



verschiedenen Cytokinen und Wachstumsfaktoren mit autokriner und parakriner Aktivität (Caplan & Dennis 2006; Caplan & Correa 2011). Cytokine wie MCP-1 und SCF wirken als Mobilisierungs- und Einwanderungssignal für MSC in ischämische Gebiete (Wang et al. 2002; Orlic et al. 2001).

### 1.1.4.3 Immunmodulation

Neben der Beteiligung von MSC an Regenerationsprozessen scheint die immunomodulierende Wirkung eine große therapeutische Bedeutung zu erlangen.

MSC werden klinisch bei graft-versus-host Reaktionen nach Knochenmark-Transplantationen erforscht, sowie bei diversen Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, systemischem Lupus erythromatosus und Morbus Crohn erprobt (Singer & Caplan 2011). Es konnte festgestellt werden, dass transplantierte MSC des Knochenmarks die Proliferation von T-Zell-Lymphozyten stark unterdrücken (Di Nicola et al. 2002) und für eine erfolgreiche Transplantation der MSC keine vollständige HLA-Kompatibilität zwischen Empfänger und Spender notwendig ist (Le Blanc et al. 2003; Tse et al. 2003).

## 1.2 Zytoskelett

Eukaryote Zellen besitzen ein aus Intermediärfilamenten, Mikrotubuli und Mikrofilamenten zusammengesetztes Zytoskelett. Auch weitere spezialisierte Zellstrukturen, Regulatorproteine wie Plektin und die innere Kernmembran, gehören mit zu den Zytoskelett-Strukturen. Mechanische Funktionen wie Zellbewegung, Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte und die Stabilisierung der Zellform, Zellformänderungen, aber auch intrazelluläre Transportvorgänge sind durch das Zytoskelett möglich. Intern und extern wirkende physikalische Kräfte beeinflussen das Zellverhalten. Informationen über die Zellherkunft und den Differenzierungsgrad können anhand bestimmter Polypeptide des Zytoskeletts erkannt werden (Broekaert 1993; Fletcher & Mullins 2010; Wiche 1998).

Die Mikrotubuli haben einen Durchmesser von 24 nm und sind essentiell für die Zellmorphologie. Sie zeigen einen polaren Aufbau mit dem (–)-Ende und dem dreifach schneller wachsenden (+)-Ende. An beiden Enden der Mikrotubuli kann Polymerisation stattfinden. Zahlreiche Proteine regulieren und induzieren die Polymerisation am schnell wachsenden Ende, während die (–)-Enden sensibler auf regulierende, depolymerisierende Stoffe wie  $\text{Ca}^{2+}$  reagieren (Summers & Kirschner 1979; Solomon 1977; Bieling et al. 2007).

Intermediärfilamente haben mit 10 nm einen Durchmesser zwischen dem der beiden anderen Zellfilamente und kommen in so gut wie allen eukaryotischen Zellen von multizellulären Organismen vor. Sie sind assoziiert mit Plasmamembranen und erfüllen vor allem strukturelle Aufgaben wie die Verstärkung der Zellen und der Plasmamembranen sowie die Organisation der Zellen in Geweben. Charakteristischer Weise sind sie sehr stabil und resistent gegen viele depolymerisierende Stoffe. Sie bestehen aus alpha-helikal gewundenen Untereinheiten, die wie ein Seil zu Filamenten verdreht sind (Lodish et al. 2000).

Die Mikrofilamente sind am kleinsten und haben einen Durchmesser von 7 nm. Die Zellform, -teilung, -adhäsion, -beweglichkeit und -signale werden durch die Aktinbündel bestimmt und durch Veränderungen der Zellumgebung beeinflusst (Volkman et al. 2001b; Carlier et al. 2003a; Bernheim-Groswasser et al. 2002).

G-Aktin ist ein längliches Protein, besteht aus zwei Domänen und wiederum zwei Subdomänen und hat eine Molekülmasse von 43 kDA (Schüler 2001; Aguda et al., 2005). Die polymeren F-Aktin Mikrofilamente entstehen durch eine reversible Polymerisationsreaktion aus monomerem, globulärem G-Aktin (Pantaloni et al., 2001). Für eine effektive Zellbewegung werden Bestandteile des ATP-abhängigen steady-state Monomer-Polymer-Kreislaufes des Aktins durch aktinbindende Proteine beeinflusst. Capping Proteine regulieren dabei inhibierend den Pool an F- und G-Aktin, indem sie die Anzahl an wachsenden (+)-Enden senken (Carlier & Pantaloni 1997; Carlier et al. 2003b; Aguda et al. 2005; Welch & Mullins 2002).

Der funktionelle Antagonismus zwischen den Capping Molekülen und dem Arp2/3 Komplex ist für den steady state entscheidend. Der Arp2/3 Komplex besteht aus 7 Polypeptiden. Der Komplex liegt normalerweise im inaktiven Zustand vor und kann je nach Art der Aktinbewegung unterschiedlich aktiviert werden. Eine Aktivierung führt zur Polymerisation der Aktinfilamente und induziert deren Verzweigung und damit Bildung von (+)-Enden. (Cossart 2000; Pantaloni et al. 2000; Volkman et al. 2001a; Bernheim-Groswasser et al. 2002; Dominguez 2009; Carlier et al. 2003b).

Die Bildung neuer Aktinfilamente aus bestehenden Aktinmonomeren heißt Aktin-Nukleation. Der Arp2/3 Komplex, durch nucleation-promoting-factors (NPFs) aktiviert, bindet dabei seitlich an das Aktin-Mutterfilament zur Ausbildung von Nukleationskeimen mit Arp2 und Arp3, welche die ersten Untereinheiten der Tochterfilamente bilden (Volkman et al. 2001a; dos Remedios et al. 2003; Welch & Mullins 2002).

### 1.2.1 Modulatoren des Aktinzytoskeletts

#### 1.2.1.1 Cytochalasin D, $C_{30}H_{37}NO_8$

Das Pilzgift Cytochalasin D (CytD) erzeugt eine Veränderung der Zellform und der Organisation der Aktinfilamente und seiner assoziierten Proteine. Es beeinflusst die Aktinpolymerisation und Elongation (Higgins & Ryan 1992; Wakatsuki et al. 2001; Brett & Tannenbaum 1985; Brown & Spudich 1979; Ujihara et al. 2008).

Über eine Bindung an die barbed (+)-Enden des Aktins beeinflusst CytD die normale Aktin-Zytoskelett-Dynamik. Die Bindung erfolgt über polare und hydrophobe Kontakte, die Stabilisierung des Kontakts über sechs hydrogenne Bindungen. CytD ist in der Lage eine Konformationsänderung durch die Aktin-Dimer-Bildung und die Aktin-katalysierte ATP-Hydrolyse zu induzieren. Es kommt zu einer  $Mg^{2+}$ -abhängigen Hemmung der letzten Schritte der Polymerisation durch CytD (Goddette & Frieden 1986a, 1986b; Nair et al. 2008).

CytD inhibiert zudem die Produktion von TNF (Tumornekrosefaktor), IL-1 und PGE2 (Prostaglandine), was wiederum das Immunsystem schwächen kann (Shinji et al. 1993).

#### 1.2.1.2 Jasplakinolide, $C_{36}H_{45}BrN_4O_6$

Jasplakinolid (Jasp) ist ein zyklisches Depsipeptid und wurde ursprünglich aus marinen Schwämmen isoliert, wie dem *Auletta* sp. und *Jaspis splendens*. Es ist membranpermeabel und wirkt polymerisierend und stabilisierend direkt auf die Aktinfilamente. Zudem beeinflusst es den Golgie-Apparat und die Organisation der Membranproteine. Durch die veränderte Integrität werden bestimmte Zellverhaltensweisen beeinflusst wie die Zytoprotektion oder die Apoptose. Es werden außerdem antikarzinogen-zytotoxische Eigenschaften diskutiert (Holzinger 2009; Posey & Bierer 1999; Lázaro-Diéguéz et al. 2008; Andavan & Lemmens-Gruber 2010; Robinson et al. 2010; Watts et al. 2011).

Ferner hat Jasp eine antimykotische Wirkung wie beispielsweise gegen *Candida albicans* (Scott et al. 1988) und eine antiparasitäre gegen Malaria (Mizuno et al. 2002).

#### 1.2.1.3 Latrunculin A, $C_{22}H_{31}NO_5S$

Latrunculin A (LatA) wird ebenfalls aus marinen Schwämmen isoliert und zwar aus dem im roten Meer vorkommenden *Latrunculia magnifica*.

Die antiproliferative Wirkung von LatA entsteht über dessen Bindung an monomeres G-Aktin. Es kommt zur Störung der Organisation des Zytoskeletts sowie physiologischer

intrazellulärer Prozesse (Ayscough et al. 1997; Rennebaum & Caflisch 2012; Spector et al. 1989).

Bereits bei submikromolaren Konzentrationen verändert es reversibel die Zellmorphologie und stört die Organisation der Mikrofilamente (Spector et al. 1983). Über die 1:1 Verbindung eines LatA mit einem monomeren G-Aktin wird dessen Polymerisation gehemmt. Durch die kristalline Struktur des Komplexes wird die Elongation der Aktinfilamente beeinflusst. LatA ist ein potenterer Hemmstoff als CytD (Coué et al. 1987; Spector et al. 1989; Yarmola et al. 2000).

### 1.3 Integrine, Mechanotransduktion

Integrine bilden die wichtigsten Adhäsionsrezeptoren für die Kontakte zwischen der Zelle und der Extrazellulären Matrix (ECM), um dadurch über funktionelle Signalkaskaden das Zellüberleben, die Zellproliferation und die Expression von mit der Differenzierung assoziierten Genen zu beeinflussen. Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, die Zelladhäsionen herbeiführen, indem sie sich mit ihrer extrazellulären Kopfregeion an verschiedene Komponente der ECM anbinden, während sich die intrazellulären Schwanzregionen über Verbindungsproteine an Teile des Zytoskeletts heften (Danen & Sonnenberg 2003; Danen 2005, 2009).

Integrine bestehen aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit, die durch nonkovalente Kontakte verbunden sind. Durch mRNA splicing entstehen diverse Varianten der Untereinheiten, wodurch die Spezifität des Integrins bestimmt wird. Durch das extrazelluläre Amino-Ende, der I-Domäne, wird die Bindung der Integrine an extrazelluläre Liganden herbeigeführt und die Auswahl der zweiten Untereinheit wie beispielsweise  $\alpha 5$  übernommen. Die transmembrane Domäne verbindet die beiden Untereinheiten. Die Affinität zum Rezeptor wird durch einen Agonisten wie Talin beeinflusst, welches an den zytoplasmatischen beta-Schwanzteil des Integrins bindet und durch eine extrazelluläre, aktivierende Konformationsänderung die Affinität des Integrins erhöht (Danen 2000; Haas & Plow 1997; Lee et al. 1995; Uitto & Larjava 1991; Buck et al. 1990; Solowska et al. 1991). Die Integrinuntereinheiten auf einer Zelle können also in multiplen Konformitäten und Bindungskräften erscheinen (Li et al. 2012).

Die Art der Adhäsion und die entsprechende Zytoskelettorganisation werden durch multiple Interaktionen der Matrixproteine mit den Integrinen modelliert. Durch die hohe Anzahl verschiedener Rezeptoren und Interaktionen können diverse Zellantworten in den verschiedenen Zelltypen erreicht werden (Couchman et al. 1990; Damsky et al. 1992; Danen et al. 2005). Für die Regulation und die Feedbackmechanismen der

Integrin-Signalgebung spielen viele Faktoren eine wichtige Rolle, wie beispielsweise SHPS-1 (transmembranöses Glykoprotein), SHP-2 (nicht-transmembranöse tyrosine Phosphatase) und Src PTKs (Src family protein tyrosine kinases) (Oh et al. 1999; Lim et al. 2005).

Auch MSC exprimieren Integrinuntereinheiten und zwar  $\alpha$ -1, -2, -3, -4, -5, -6, -10, -11, -L, -V, -X und  $\beta$ -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 und -8 (Prowse et al. 2011; Conget & Minguell 1999).

Biologische Funktionen von MSC können durch mechanische Kräfte Integrin-vermittelt stimuliert werden, vor allem  $\beta$ 1-Integrin übernimmt die Mechanotransduktion in MSC (Kasten et al. 2010). Die Mechanotransduktion beschreibt die Umwandlung von mechanischen Stimuli in chemische Antworten (Kolahi & Mofrad 2010). Auf die Zelloberfläche wirkende mechanische Kräfte können so sofort zu molekularen intrazellulären Veränderungen in Zytoplasma und Kern führen. Ein Signalweg für mechanische Signale wird durch die molekularen Verbindungen zwischen den Integrinen, dem Zytoskelett und dem Nukleus geschaffen. Aktin- und Intermediärfilamente übernehmen die Kraftübertragung auf den Kern (Maniotis et al. 1997). Durch mechanische Stressausübung auf die Zellen kann es zu deutlichen Veränderungen in der Signalverteilung der Zelle kommen, während die Morphologie der Zellen unverändert bleiben kann (Rychly et al. 1998; Thoumine et al. 1995).

Zudem führt die mechanische Reizung von Integrinuntereinheiten zu einer Erhöhung von tyrosin-phosphorylierten Proteinen und deren Anheftung am Zytoskelett. Es folgen Signalkaskaden wie die über den Fokale-Adhäsions-Kinasen (FAK)-Weg. Die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) wird dadurch verstärkt phosphoryliert und damit aktiviert. Integrine vermitteln also mechanisch induzierte, MAPK-assoziierte Genexpressionen (Schmidt et al. 1998; Glossop & Cartmell 2009; Pommerenke et al. 2002).

Auch der zu den MAPK gehörende extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK)1/2-Signalweg wird bei mechanischer Reizung in MSC stimuliert. Dieser führt zu einer Neuorganisation der Aktinfilamente und der Veränderung von Genexpressionen.

Über verschiedene Mechanismen der Mechanotransduktion kann zwischen unterschiedlichen Kräften differenziert und dementsprechend die Differenzierung und Expression in MSC beeinflusst werden. Die genaue Mechanosensitivität der MSC kann bisher jedoch nicht vollends erklärt werden (Rhee et al. 2006; Kim et al. 2007; Pelaez et al. 2012; Ghazanfari et al. 2009; Haudenschild et al. 2009; Steward et al. 2013;

Wang & Thampatty 2008). Sicher ist jedoch, dass mechanische Beanspruchung zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege führen kann (Hornberger et al. 2005) und auch, dass mechanische und chemische Stimuli am selben Rezeptor unterschiedliche Effekte und Antworten verursachen (Wang et al. 2007). MSC können biophysikalische Gegebenheiten wie Substratsteifigkeit und Topographie erfassen, wodurch die Differenzierung der MSC beeinflusst wird (Zajac & Discher 2008; Yim & Sheetz 2012; Pizzo et al. 2005; Guilak et al. 2009). Die Umgebungsinformationen werden über kontraktile Kräfte erfasst und in biochemische Signale umgewandelt (Winer et al. 2009; Li et al. 2013).

Auch eine Modulierung des Zytoskeletts durch Pharmaka kann die durch mechanische Effekte verursachte Signaltransduktion sowie die Differenzierung der MSC verändern (Müller et al. 2013).

### 1.3.1.1 $\alpha 5\beta 1$ -Integrin

$\alpha 5\beta 1$ -Integrin ist der klassische Adhäsionsrezeptor, mit dem die Zelle vor allem an Fibronectin bindet (Danen et al. 2002; Huveneers et al. 2008).

Das Integrin  $\alpha 5\beta 1$  nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Angiogenese ein und wird vor allem in proliferierendem Endothelium exprimiert (Boudreau & Varner 2004). Kommt es zu einer Entartung des Gewebes, ist auch in den tumorösen Gefäßen eine erhöhte Expression des  $\alpha 5\beta 1$ -Integrins zu beobachten (Kim et al. 2000).

Bei inflammatorischen Prozessen kommt es unter anderem zu einer erhöhten  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-abhängigen Monozyt-Vaskularepithel-Adhäsion und -Transmigration. Die folgende Aktivierung der intrazellulären Signalwege FAK und ERK über die Integrine führt zur erhöhten Freisetzung inflammatorischer Cytokine (Yang et al. 2012).

## 2 Frage- und Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Kenntnisse über die Rolle des Aktinzytoskeletts bei der funktionellen Steuerung humaner mesenchymaler Stammzellen nach mechanischer Belastung der  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  Integrinuntereinheiten zu vertiefen. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  eine unterschiedliche Rolle bei der Mechanotransduktion spielen. Dabei wird die Beteiligung und Bedeutung des intakten Aktinzytoskeletts an der Mechanotransduktion durch den Einsatz von depolymerisierenden und polymerisierenden Substanzen verdeutlicht.

Die resultierenden Effekte auf die Signaltransduktion von MSC werden durch die Aktivierung der Signalmoleküle Erk, Akt und Molekülen der Src-Familie beurteilt.

Die funktionellen Effekte werden durch die Expression von Kollagen Typ 1 untersucht.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

Costar® 96-Well EIA/RIA Stripwell™ Plate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
Criterion Stain Free Gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Deckgläser (Menzel GmbH, Braunschweig)  
Dynabeads® M-280 Schaf anti-Maus IgG (Dyna, Hamburg)  
Filterpapier (Whatman, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien)  
Low Protein Binding Tubes (Sarstedt, Nümbrecht)  
Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen)  
Objektträger (Engelbrecht GmbH, Edermünde)  
Plastikwaren (Greiner Bio-One, Frickenhausen)  
PVDF-Membranen (Roche, Basel, Schweiz)  
Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

#### **3.2 Geräte**

Anlage zur Erzeugung eines inhomogenen Magnetfeldes für die mechanische Stimulation  
BD FACS Calibur® Flow Cytometer (BD Biosciences, Heidelberg)  
CASY® Cell Counter (OLS, Bremen)  
ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Vertikale Proteingelkammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Western-Blot Tanks (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Karlsruhe)  
Fokales Laser-Scanning-Mikroskop 780 (Carl Zeiss AG, Jena)  
AxioCam Cc1 (Carl Zeiss AG, Jena)  
Lichtmikroskop Axiovert 40C (Carl Zeiss AG, Jena)

#### **3.3 Software**

BD FACSSStation® data management system (BD Biosciences, Heidelberg)  
Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA)  
SPSS Statistics 22 (IBM Softwares, Ehningen)  
SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, USA)  
Quantity One® 1-D Analysis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)



### 3.4 Chemikalien

Antibiotische-antimykotische Lösung (AB/AM) (Invitrogen, Karlsruhe)  
Cytochalasin D (Calbiochem, Merck, Darmstadt)  
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe)  
DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Fetales Kälberserum (PAN-Biotech, Aidenbach)  
Glycin (Carl Roth, Karlsruhe)  
Jasplakinolide (Calbiochem, Merck, Darmstadt)  
Ladepuffer (Laemmli, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
Latrunculin A (Calbiochem, Merck, Darmstadt)  
Lyse-Puffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Methanol (Carl Roth, Karlsruhe)  
Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG (Invitrogen-Dynal AS, Oslo, Norwegen)  
Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe)  
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Invitrogen, Karlsruhe/ Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Phalloidin Alexa 546 (Molecular Probes, Eugene, USA)  
Propidiumjodid (Molecular Probes, Eugene, USA)  
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)  
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo-Scientific, Rockford, USA)  
Tris/Glycine/SDS-Buffer 10x (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Tris/Glycin-Buffer 10x (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)  
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (Carl Roth, Karlsruhe)  
Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)  
Tween20 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien)

### 3.5 Antikörper

β1-Integrin Maus-Antikörper, monoklonal (Beckman Coulter, Fullerton, USA)  
α5-Integrin Maus-Antikörper, monoklonal (Beckman Coulter, Fullerton, USA)  
Kaninchen anti-Maus IgG-Cy3 (Dianova, Hamburg)  
p44/42 MAPK (ERK 1/2) Kaninchen-Antikörper, polyklonal (Cell Signaling, Boston, USA)  
Schwein anti-Maus IgG/HRP, polyklonal (Dako, Hamburg)  
Schwein anti-Kaninchen IgG/HRP, polyklonal (Dako, Hamburg)

## Material und Methoden

Vinculin Maus-Antikörper, monoklonal, Clone hVIN-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

### 3.6 Kits

Bio-Plex® Phospho-Akt (S473) Assay (BioRad Laboratories, Hercules, USA)

8-Plex Src FamilyKinase magnetic bead kit (Millipore, Billerica, USA)

Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

### 3.7 Methoden

#### 3.7.1 Zellgewinnung

Für die durchgeführten Versuche wurden Knochenmarksspenden von Patienten der Klinik für Herzchirurgie (Universitätsmedizin Rostock) zur Präparation der MSC zur Verfügung gestellt. Das Knochenmark wurde in der Klinik während einer medianen Sternotomie mit Hilfe einer Hohnadel mit Mandrin punktiert und in 20 ml Spritzen aspiriert. Zur Antikoagulation wurde das Knochenmark 1:2 mit PBS/EDTA verdünnt und zur weiteren Bearbeitung dem Arbeitsbereich für Zellbiologie übergeben. Über die Dichtegradientenzentrifugation wurden die mononukleären Zellen isoliert. Dazu wurde das Knochenmark in Pancoll Röhrchen überführt, dann bei Raumtemperatur für 15 min bei 2300 rpm zentrifugiert. Der entstandene milchige Lymphozytenring wurde abgetragen, mit PBS gewaschen und das Sediment in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet, zu welchem fetales Kälberserum (FKS) bis zu einer Endkonzentration von 10 % und eine antibiotische/antimykotische Lösung in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt wurde.

Die Kultur der Zellen erfolgte in T-25 Kulturflaschen. Nach 3 d wurden nicht adhärierte Zellen durch Waschschrte mit PBS entfernt. Bei 80 %iger Konfluenz wurde eine Zellpassage durchgeführt.

Bei einer Zellpassage wurde nach dem Spülvorgang mit PBS Trypsin zugegeben und die Flaschen für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in serumhaltigem Medium resuspendiert, um das Trypsin zu inaktivieren. Anschließend wurden die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt. Dieser Schritt war notwendig, da bei einem durchgängigen Zellrasen das Zellwachstum durch die Konfluenz gehemmt wird oder es zu einer Ablösung des Rasens und damit zum Verlust der Zellen kommen kann.

Die Inkubation erfolgte grundsätzlich unter standardisierten, konstanten Bedingungen bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Jegliche Arbeiten mit den Zellen fanden unter einer Sicherheitswerkbank statt.

#### 3.7.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit dem Zellzählgerät Casy der Firma Schärfe Systems bestimmt. Die CASY®-Technology basiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore. Zellen mit intakter Zellmembran schließen den

elektrischen Strom aus und generieren ein Signal, das vom Volumen der Zelle abhängt (Electrical Current Exclusion ECE®). Tote Zellen mit einer geschädigten Zellmembran können den Strom nicht mehr ausschließen und werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst.

Zur Messung werden von der Zellsuspension 100 µl abgenommen und in ein Messgefäß mit 10 ml CasyTone -Lösung gegeben und gezählt.

### 3.7.3 Mechanische Reizung der Integrinuntereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$

Für den Reizversuch wurden 8000-9000 Zellen pro Well auf einer 96-Stripwellplatte (Costar®96-Well EIA/RIA Stripwell Plate) ausgesät. Um den Einfluss des Serums zu reduzieren, wurden diese Zellen vor dem Experiment für 24 h in Kulturmedium mit nur 0,5 % FKS kultiviert.

#### 3.7.3.1 Mikrobeads

Die paramagnetischen Mikrobeads mit einer Größe von 2,8 µm wurden zentrifugiert, das Sediment in 500 µl PBS aufgenommen und versetzt mit 2 µg Maus-anti- $\beta 1$ - oder  $\alpha 5$ -Integrin-Antikörper für eine Stunde schüttelnd inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Sediment nochmals mit PBS gewaschen und in DMEM mit 1 % Antibiotikum resuspendiert.

#### 3.7.3.2 Modulatoren des Aktinzytoskeletts

Für die durchgeführten Versuche wurden drei in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöste Modulatoren verwendet. Um abzusichern, dass die zellulären Effekte auf die Modulatoren und nicht auf das Lösungsmittel zurück zu führen waren, wurden Kontrollzellen, kultiviert in DMEM mit 0,1 % DMSO, mitgeführt. Die Modulatoren wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,5 µM Cytochalasin D (CytD), 0,01 µM Jasplakinolide (Jasp) und 0,1 µM LatrunculinA (LatA). Sie wurden in Konzentrationen eingesetzt, in denen sie das Aktinzytoskelett zwar beeinflussen, jedoch nicht die Zellvitalität beeinträchtigen (Müller et al. 2013).

#### 3.7.3.3 Versuchsaufbau

Die mechanische Belastung der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  oder  $\alpha 5$  erfolgte mittels einer Anlage, die im Arbeitsbereich Zellbiologie entwickelt wurde (Pommerenke et al. 1996). Hierbei handelt es sich um eine Spule mit einem Eisenkern und zwei Polen. Die Pole sind unterschiedlich geformt. Ein spitzer Pol und ein flacher Pol sorgen für das

## Material und Methoden

Entstehen eines inhomogenen Magnetfeldes. Zwischen den Polen besteht ein Abstand von 1 cm. Das erzeugte Magnetfeld hat etwa eine Stärke von 0,0015 T.

Zwischen den Polen der Spule wurde für 15 Minuten ein Well positioniert und die Zellen dem elektromagnetischen Feld ausgesetzt. Durch die Kopplung der Rezeptoren mit den Microbeads entstanden Zugkräfte parallel zur apikalen Zellseite in horizontaler Ebene.

Die Proben setzten sich wie folgt zusammen:

1. Kontrolle (Ko): Unbehandelte Zellen
2. Magnetfeld (MF): Einfluss des Magnetfeldes auf das Aktivierungsniveau der Signalmoleküle. Dauer der mechanischen Belastung im MF: 15 min.
3. Clustern (CI): Mechanische Belastung der Rezeptoren durch Beladung mit Microbeads ohne MF. Dauer der Belastung: 30 min im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Integrin-Reiz (Reiz): Mechanische Belastung der Integrine durch Beladung mit Microbeads (Inkubation 30 min) und Ausübung von Zugkräften durch das Magnetfeld für 15 min.

Versuchsansatz A: Nachweis einer Aktivierung von Signalmolekülen nach mechanischer Belastung von Integrinen. Untersuchungszeitpunkte waren: 0 min, 30 min, 60 min und 6 h nach der Belastung der Integrine.

Versuchsansatz B: Einfluss von Zytoskelett-Modulatoren auf die Aktivierung von Signalmolekülen bei mechanischer Belastung von Integrinuntereinheiten. Die mechanische Belastung der Zellen erfolgte in Gegenwart der Zytoskelett-Modulatoren CytD, Jasp und LatA. Die Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit diesen Modulatoren inkubiert. Gleichzeitig wurde in dieser Zeit auch das FKS des Kulturmediums auf 0,5 % reduziert. Die Analyse der Zellen auf die Aktivierungen von Signalmolekülen erfolgte 30 min nach der jeweiligen Belastung mit Magnetfeld, Clustern oder Reiz. Als Kontrolle fungierten unbehandelte Zellen.

Für die Analyse des Kollagen Typ 1 wurden die Proteine 48 h nach Mechanotransduktion in Gegenwart der Modulatoren gewonnen.

Eine Zellzyklusanalyse wurde unter den Modulatoren ohne mechanische Belastung durchgeführt.

### 3.7.4 Durchlichtmikroskopie

Das Durchlichtmikroskop erlaubt die morphologische Betrachtung sowie die Beurteilung der Zellvitalität und Adhäsion. Dazu wurden etwa  $2 \times 10^4$  MSC in Petrischalen (Durchmesser=3,5 cm) ausgesät und 24 h mit den Zytoskelett-Modulatoren unter den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Mittels Durchlichtmikroskop erfolgte die Bewertung der Zellen hinsichtlich morphologischer Änderungen durch die Modulatoren.

### 3.7.5 Immunfluoreszenz

Das Prinzip der farblichen Darstellung von Antigenen durch deren Bindung an fluoreszierende, d.h. mit Fluorochrom markierte sekundäre Antikörper wurde zur Darstellung von Integrinen ( $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ) und Vinculin genutzt. Veränderungen am Zytoskelett/Aktin wurden mit Phalloidin Alexa 546 sichtbar gemacht. Für die Immunfärbung wurden etwa  $2 \times 10^4$  Zellen pro Deckglas (20x20 mm) ausgesät und 24 h mit den Zytoskelett-Modulatoren unter den angegebenen Konzentrationen inkubiert.

Vor der anschließenden Fixation der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) über 10 min wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton X 100 für 10 min permeabilisiert. Das Präparat wurde erneut mit PBS gewaschen und dann 1 h mit dem primären Antikörper bzw. Phalloidin Alexa 546 (Verdünnung 1:100) inkubiert. Nach einem Waschschriff mit PBS folgte eine 30-minütige lichtgeschützte Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:200). Zur Kernfärbung wurde Hoechst 33342 (Verdünnung 1:1000) verwendet. Die Präparate wurden anschließend mit PBS gewaschen, mit Fluoroshield eingebettet und bis zur Auswertung bei 4° C gelagert.

### 3.7.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) werden die Fluoreszenzen eines Präparates durch einen Laserstrahl hervorgerufen, welcher das Präparat punktwise abtastet. Die emittierten Fluoreszenzen werden detektiert.

Über die konfokale Blende in der Zwischenbildebene werden dünne optische Schnitte aus einem Präparat aufgenommen.

Zur Auswertung der vorbereiteten Immunfluoreszenzpräparate wurde das fokale LSM Zeiss 780 genutzt.

### 3.7.7 Zellyse

Die Zellyse in den Wells erfolgte, je nach Fragestellung, 30 min oder 48 h nach der mechanischen Belastung.

Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden 30 µl BioRad Lysepuffer in jedes Well gegeben. Nach mindestens 30 min Inkubation auf Eis wurden die Lysate eingesammelt, für 15 min zentrifugiert und der Überstand als endgültiges Protein in neue Probengefäße überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

### 3.7.8 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde das Qubit Protein Assay Kit nach Herstellervorschrift benutzt. Jede Proteinbestimmung erfolgte in Doppelbestimmung.

### 3.7.9 Gelelektrophorese

Gleiche Proteinmengen wurden mit 5x Laemmli versetzt und bei 95° C für 5 min denaturiert.

Für die SDS-Page wurden Criterion Stain-Free-Gele genutzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromspannung von 120 V. Die gleichmäßige Proteinbeladung des Gels wurde mittels Chemi Doc MP Imaging System überprüft.

Zusammensetzung Laufpuffer, pH 8,3

H <sub>2</sub> O	
Tris	75 mM
Glycin	565 mM
SDS	10 mM

**Tab. 1: Laufpuffer**

### 3.7.10 Western-Blot

Zum Übertragen der Proteine aus dem Gel auf eine Membran, hier Polyvinylidenfluorid (PVDF), wurde das Tank-Blot Verfahren angewendet.

Der Transfer erfolgte über Nacht bei 140 mA. Um noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese für 1 h in 5 %iger Blockierungsmilch inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:1000) erfolgte über Nacht bei 4° C. Es folgten 3 Waschschrte mit Waschpuffer, um den ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10000) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Die Proteine wurden im Chemi Doc MP Imaging System detektiert. Zur

densitometrischen Auswertung wurden die Programme Quantity One® 1-D Analysis und Image Lab™ herangezogen.

### Zusammensetzung Blockmilch 5 %

Fettarmes	25 g
Milchpulver	
Waschpuffer	500 ml

### Tab. 2: Blockmilch

### Zusammensetzung Transferpuffer

H <sub>2</sub> O	
Tris	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20 %

### Tab. 3: Transferpuffer

### Zusammensetzung Waschpuffer, pH 7,5

H <sub>2</sub> O	
Tris	10 mM
NaCl	10 mM
Tween 20	0,1 %

### Tab. 4: Waschpuffer

#### 3.7.11 BioPlex Array Reader

Zur Detektion von Proteinexpressionen und Phosphorylierungen in Zelllysaten kann das BioPlex Verfahren verwendet werden.

Es wurden mit verschiedenen Antikörpern beschichtete Beads zur Verfügung gestellt, welche spezifisch an ein Protein binden. Den entsprechenden Proteinen sind je eine bestimmte Fluoreszenz zugeordnet. So konnten auf Grund der Variationen in den Emissionsspektren der Beads mehrere Proteine gleichzeitig in einer Probe detektiert werden.

Die Proben wurden in 96-Wellplatten mit Antikörper beschichteten Beads für 12 h inkubiert. Nach 3 Waschrissen wurden die Beads für 30 min mit dem sekundären biotinylierten Antikörper inkubiert. Dieser war gegen ein anderes Epitop des



Zielproteins gerichtet und diente der Bindung des nach erneutem Waschen der Beads zugesetzten fluoreszierenden Streptavidin-Reporters. Über die Fluoreszenzfarbe der Beads identifiziert der rote Laser das Protein. Die Unterschiede in der Fluoreszenzfarbe ergeben sich dadurch, dass im Inneren der Beads zwei fluoreszierende Flüssigkeiten in unterschiedlichem Mischungsverhältnis vorliegen.

Der BioPlex® Phospho-Akt (S473) Assay wurde zur Detektion von p-Akt, p-NFκB, p-IκB-α und p-STAT 2 verwendet. Das nach demselben Prinzip funktionierende Milliplex® MAP 8-Plex Human Src Family Kinase Kit wurde zur Detektion von Tyrosin-Phosphorylierungen bei Src (Tyr419), Fyn (Tyr420), Yes (Tyr421), Lck (Tyr394), Lyn (Tyr397), Fgr (Tyr412), Blk (Tyr389) und Hck (Tyr411) verwendet.

Die 96-Wellplatten wurden nach Anleitung und Vorgaben des Herstellers vorbereitet und analysiert.

### 3.7.12 Durchflusszytometrie BD FACS Calibur® Flow Cytometer

Die Durchflusszytometrie ermöglicht aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen auch eine Analyse der Zellzyklusphasen von Zellen in Suspension. Als Fluoreszenzfarbstoff für die Zellzyklusphasenanalyse wurde Propidiumjodid (PI, Konzentration 50 µg/ml) verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff (Exzitation 488nm, Emission 600nm) bindet stöchiometrisch an doppelsträngige DNS. Das detektierte Fluoreszenzsignal ist damit als Maß des DNS Gehalts der Zellen anzusehen. Die mit PI inkubierten Zellen können so prozentual den unterschiedlichen Phasen (G0/G1 diploid,  $2n < s < 4n$ , G2/M tetraploid) des Zellzyklusses zugeordnet werden. Apoptotische Zellen (A) sind durch eine DNS-Fragmentierung gekennzeichnet und haben damit einen geringeren DNS Gehalt als diploide Zellen (G0/1). Diese Zellen liegen im Histogramm vor dem G0/1 Peak und werden als Sub-G0/1 Peak bezeichnet.

Die Zellen wurden zunächst für 1 d bzw. 5 d unter Zusatz der Modulatoren des Zytoskeletts kultiviert. Anschließend wurden die Zellen passagiert, zentrifugiert und das Pellet unter Zentrifugation (5 min, 1200 rpm) mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in kaltem 70 %igen Ethanol fixiert. Um eine Irritation der Analyse durch doppelsträngige RNA zu vermeiden, wurden die Zellen 30 min mit RNase (Konzentration 1 mg/ml) im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 1200 rpm) wurde das Zellsediment in 500 µl Propidiumjodid (Konzentration der Arbeitslösung 5 µg/ml) aufgenommen. Die Ergebnisse wurden durch das BD FACS Station® data management system in einem Histogramm dargestellt.

### 3.7.13 Statistik und Auswertung

Es wurden drei bis fünf Wiederholungen der Experimente durchgeführt und jeweils Zellen aus verschiedenen Präparationen verwendet.

Über die Analysen der durchgeführten Western Blots und der Bio-Plex-Assays wurden die Messdaten gewonnen und in Microsoft Excel 2010 erfasst. Es wurden alle Werte zu ihren jeweiligen Kontrollen relativiert, anschließend die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Diese Werte wurden mithilfe von SPSS durch einen ungepaarten t-Test analysiert, wobei drei Schwellen der Irrtumswahrscheinlichkeit ermittelt wurden und in der vorliegenden Arbeit wie folgt gekennzeichnet sind:

$p \leq 0,05$ : \*

$p \leq 0,01$ : \*\*

$p \leq 0,001$ : \*\*\*

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Morphologie der MSC unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts

Zum Nachweis der Wirkung der verwendeten Modulatoren auf die Morphologie der MSC wurden diese nach Kultivierung lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 1).

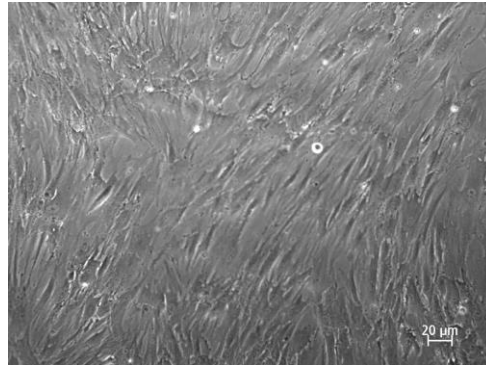
Bei der Kultivierung der Kontrollzellen weisen diese eine stammzelltypische Morphologie auf, sie sind fibroblastenähnlich, d.h. länglich, schmal und ohne Fortsätze. Bei der Kultivierung unter Zugabe von CytD kommt es dagegen zu starken morphologischen Veränderungen der Zellen. Die MSC sind rundlicher und bilden mehrere längliche Fortsätze aus.

Zu weniger stark ausgeprägten Veränderungen kommt es bei der Kultivierung unter Zusatz von Jasp. Die MSC behalten ihre längliche Struktur, verbreitern sich jedoch.

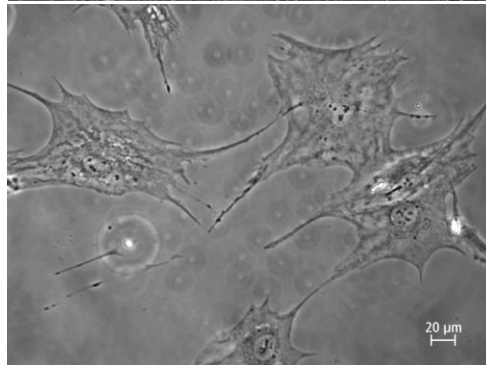
Bei der Kultivierung in Gegenwart von LatA sind die MSC deutlich rundlicher mit stark verzweigten, länglichen Fortsätzen. Zum Teil sind die Zellen bei dieser Konzentration schon vollständig abgerundet.

## Ergebnisse

**Kontroll-  
zellen**



**CytD  
0,5 µM**



**Jasp  
0,01 µM**



**LatA  
0,1 µM**



**Abb. 1: Morphologie der MSC unter Inhibitoren des Aktinzytoskeletts.  
Lichtmikroskopische Aufnahmen, 32x Objektiv.**

## Ergebnisse

### 4.2 Immunfluoreszenz-Darstellung von $\beta 1$ und $\alpha 5$ Integrinuntereinheiten und von Aktin unter dem Einfluss von Modulatoren des Aktinzytoskeletts

Um genauere Informationen über die veränderte Organisation von Strukturen des Zytoskeletts durch die verwendeten Modulatoren zu erhalten, wurden F-Aktin und die Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  nach einer Kultivierung mit den Modulatoren mittels der Immunfluoreszenz dargestellt.

Die Abbildung 2 zeigt Aufnahmen des Aktins und der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  bei MSC nach 24 h Kultivierung mit den Modulatoren des Aktinzytoskeletts CytD, Jasp und LatA.

Die Kontrollzellen zeigen eine gleichmäßige Aktinstruktur. Die Aktinfilamente sind linear und größtenteils parallel entlang der Zelle angeordnet.

Die Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  sind gleichmäßig in den Zellmembranen verteilt.

Unter dem Einfluss von CytD ist nach 24 h eine deutliche Zerstörung des Zytoskeletts zu sehen. Nur noch vereinzelt ist das intakte Aktin erkennbar. Größtenteils bestimmt jedoch das zerstörte, im Zytoplasma verteilte Aktin das Bild.

Jasp hat einen stabilisierenden Einfluss auf das Zytoskelett. Erkennbar ist dieser an verdickten Aktinfilamenten, die weniger parallel angeordnet sind als bei den Kontrollzellen. Sie ziehen in Bündeln in die kleinen Fortsätze der MSC.

Nach der Kultivierung mit LatA erkennt man, ähnlich wie bei CytD, ein größtenteils zerstörtes Aktinzytoskelett. Die Fragmente sind gleichmäßig im Zytoplasma der rundlichen Zellen verteilt und zum Teil auch in den langen schmalen Fortsätzen erkennbar. Nur sehr vereinzelt erkennt man kurze Stücke eines intakt scheinenden Aktinfilaments.

Die Integrine sind auch unter dem Einfluss der Modulatoren deutlich sichtbar.

## Ergebnisse

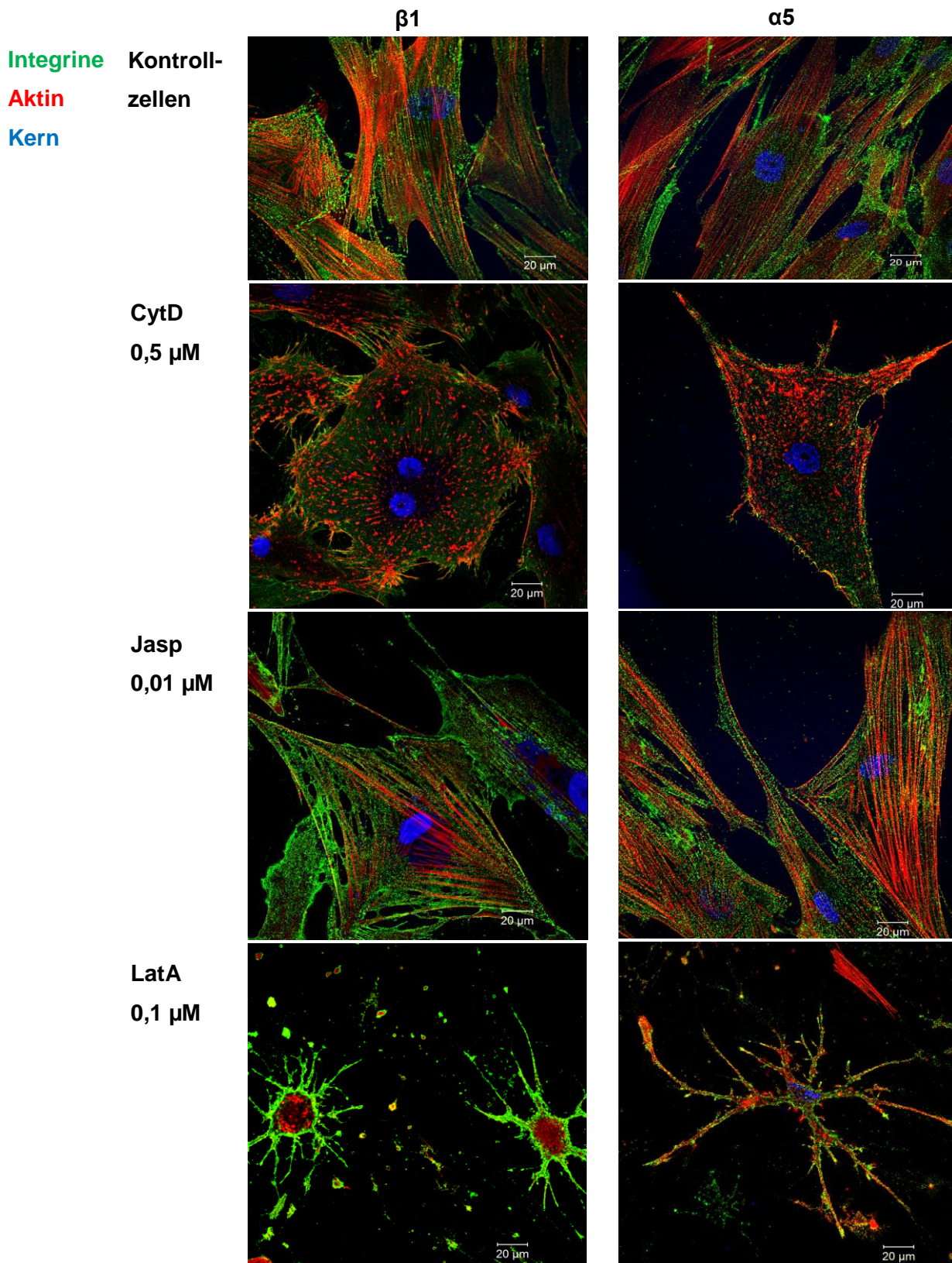


Abb. 2: Darstellung von  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  Integrinuntereinheiten und Aktin unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts der MSC. Konfokale Lasermikroskopie Aufnahmen, 63x Ölobjektiv.

## Ergebnisse

### 4.3 Aktivierung von Signalproteinen nach Reiz an den Integrinuntereinheiten $\beta 1$ und $\alpha 5$

#### 4.3.1 Aktivierung von Erk und Akt

Um die Mechanotransduktion in den MSC weiter zu untersuchen, stellte sich die Frage, ob es einen Unterschied in der Aktivierung von Signalproteinen gibt, je nachdem, ob die mechanische Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  oder der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$  erfolgt.

Das Signalmolekül Erk zeigt eine deutliche transiente Aktivierung 0 min und 30 min nach mechanischer Belastung durch das Clustern und den Reiz der Integrinuntereinheit  $\beta 1$ . Diese Aktivierung geht nach 6 h auf das Kontrollniveau zurück (Abb. 3A). Dargestellt ist nur eine Einzelmessung, welche die Ergebnisse voran gegangener Arbeiten bestätigt (Müller et al. 2013).

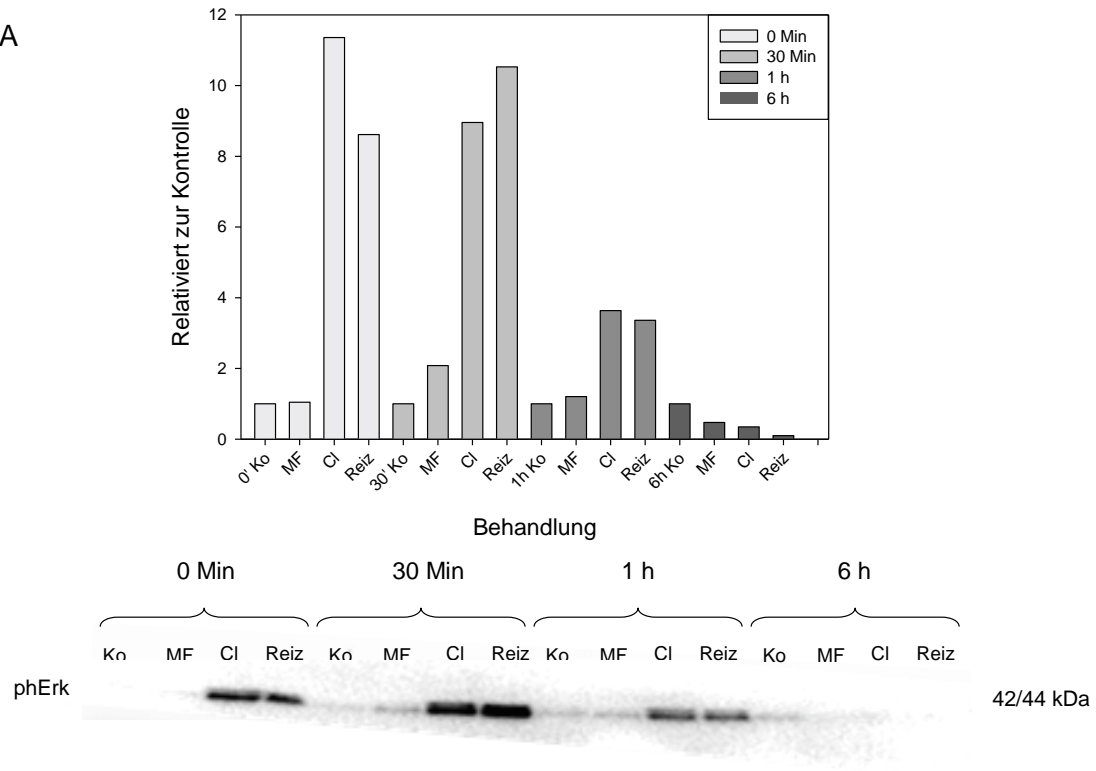
Belastet man dagegen die Integrinuntereinheit  $\alpha 5$ , wird die stärkste Aktivierung von Erk durch den mechanischen Reiz erst nach 1 h dokumentiert.

Nach 6 h erreicht die Aktivierung von Erk den Level ungestresster Zellen und ähnelt darin der Aktivierung durch die mechanische Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  (Abb. 3B).

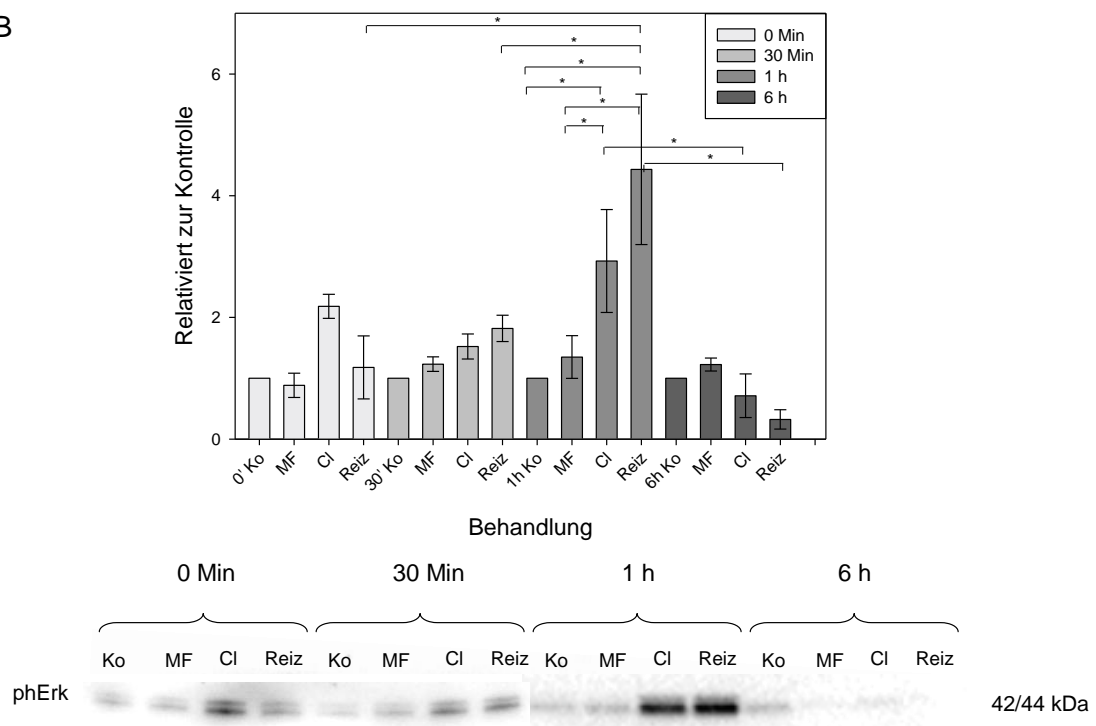
In allen nachfolgenden Experimenten wurde auf Grund dieser Ergebnisse der Effekt der mechanischen Belastung nach 30 min gemessen.

## Ergebnisse

A



B



**Abb. 3: Aktivierung von Erk nach Belastung der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  (A) und  $\alpha 5$  (B).**



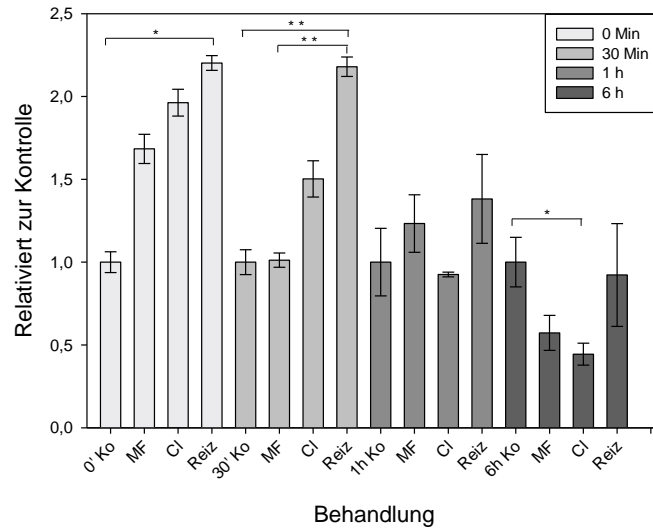
## Ergebnisse

Bei der Analyse der zeitlichen Aktivierung des Signalproteins Akt ist kein Unterschied zwischen der Belastung der  $\beta 1$  oder der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheit feststellbar.

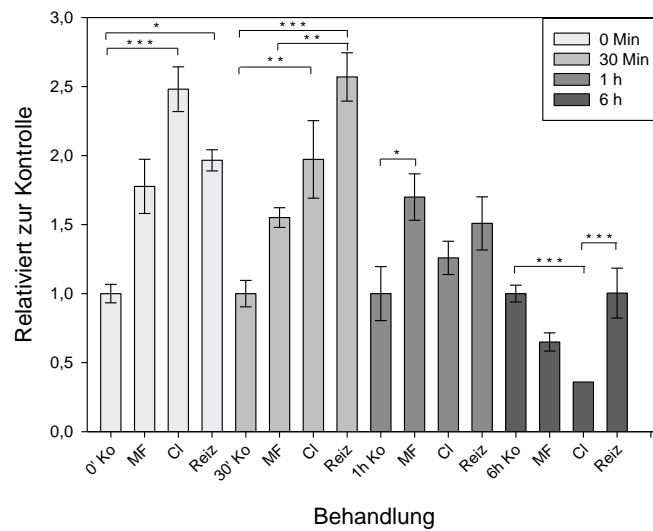
Zu sehen ist bei beiden Integrinuntereinheiten ein transienter Verlauf mit einer Aktivierung direkt und 30 min nach der Belastung durch das Clustern und den mechanischen Reiz, sowie ein Abfall der Aktivierung nach 1 h und noch deutlicher nach 6 h (Abb. 4).

## Ergebnisse

A



B



**Abb. 4: Aktivierung von Akt nach Belastung der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  (A) und  $\alpha 5$  (B).**

### 4.3.2 Expression von NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B und STAT2 nach Mechanotransduktion über die Integrinuntereinheiten $\beta$ 1 und $\alpha$ 5

Es wurden neben der Expression von Erk und Akt auch Faktoren wie NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B und STAT2 nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheiten  $\beta$ 1 und  $\alpha$ 5 analysiert, um nähere Informationen über die Rolle der Mechanotransduktion durch die Integrinuntereinheiten und den Einfluss der Mechanik auf Transkriptionsfaktoren zu erhalten. Zur Analyse der Zelllysate wurde der BioPlex Array Reader verwendet.

Die Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zeigt einen deutlichen Anstieg nach der mechanischen Belastung durch die Clusterung und den Reiz an der Integrinuntereinheit  $\beta$ 1 zu jedem Zeitpunkt der Auswertung. Die Höhe des Anstiegs ist ebenfalls zu jedem der vier Zeitpunkte annähernd gleich (Abb. 5A).

Belastet man die Integrinuntereinheit  $\alpha$ 5 mechanisch, kommt es zu keiner signifikanten Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors und es zeigt sich lediglich ein ähnlicher Trend wie bei der mechanischen Belastung der Untereinheit  $\beta$ 1 (Abb. 5B).

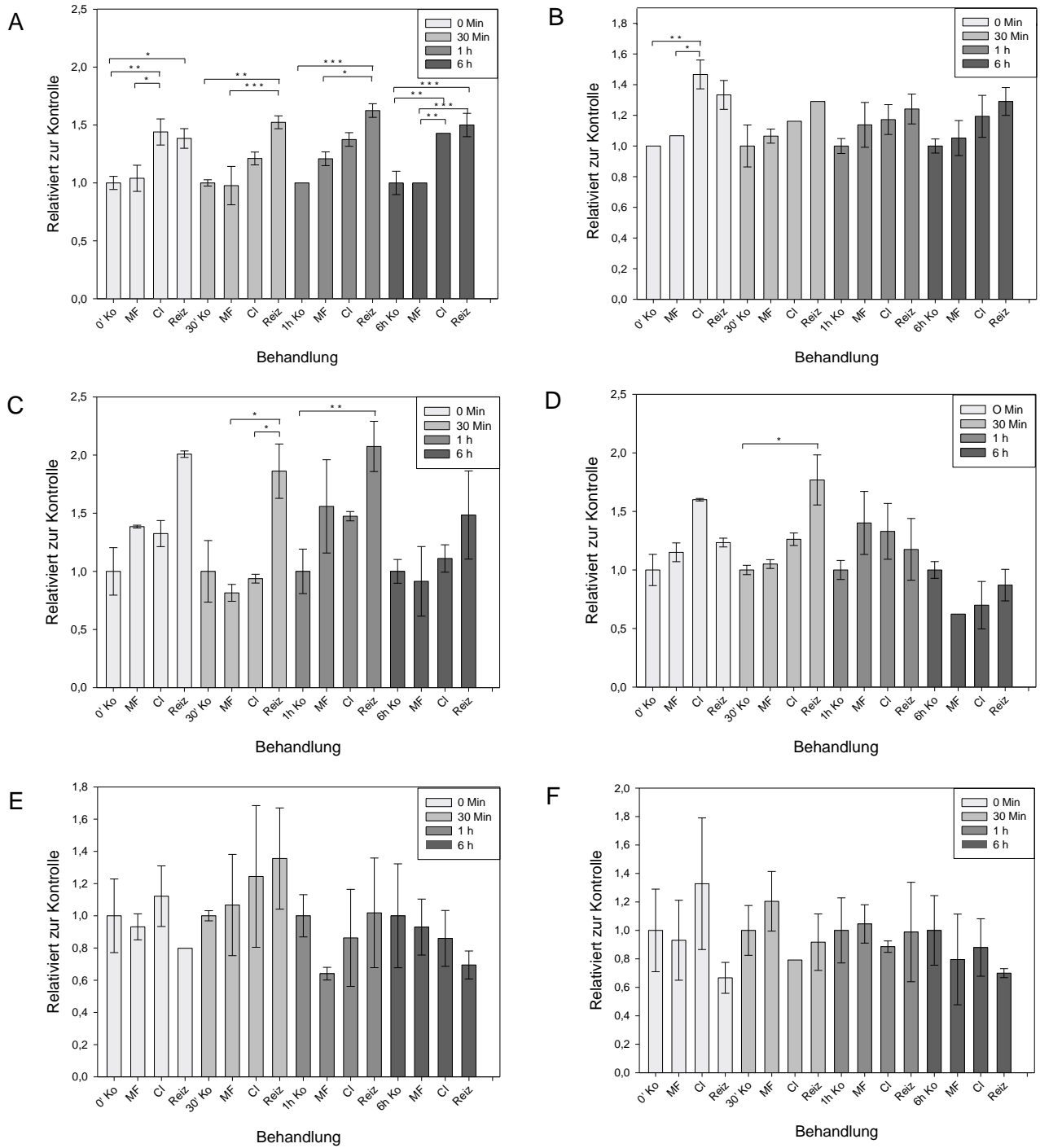
Das Protein I $\kappa$ B, Inhibitor von NF $\kappa$ B, zeigt eine gesteigerte Expression direkt, 30 min und 1 h nach der mechanischen Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta$ 1, mit gleichbleibend hohem Aktivierungslevel (Abb. 5C).

Erfolgt die Mechanotransduktion über die Integrinuntereinheit  $\alpha$ 5, ist ein deutlicher Anstieg der Expression von I $\kappa$ B erst nach 30 Min zu sehen und zudem bereits nach 1 h wieder abgefallen (Abb. 5D).

Verglichen mit der mechanischen Belastung von  $\beta$ 1 ist die Mechanotransduktion über die Integrinuntereinheit  $\alpha$ 5 weniger effektiv, um die Expression von I $\kappa$ B zu beeinflussen. Zudem ähnelt der transiente Verlauf der Aktivierung von I $\kappa$ B bei  $\alpha$ 5 nicht demjenigen von  $\beta$ 1, wie dies bei NF $\kappa$ B der Fall ist.

Für den Transkriptionsfaktor STAT2 lassen sich keine Änderungen in der Expression nach mechanischer Belastung der beiden Integrinuntereinheiten feststellen. Weder  $\beta$ 1 noch  $\alpha$ 5 scheinen diesen Faktor bei unserem Versuchsaufbau zu beeinflussen (Abb. 5E und 5F).

## Ergebnisse



**Abb. 5: Expression von NFκB nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheiten β1 (A) und α5 (B); Expression von IκB nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheiten β1 (C) und α5 (D); Expression von STAT2 nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheiten β1 (E) und α5 (F).**

## Ergebnisse

### 4.4 Aktivierung von Signalproteinen nach Reiz an den Integrinuntereinheiten $\beta 1$ und $\alpha 5$ unter dem Einfluss von Modulatoren des Aktinzytoskeletts

#### 4.4.1 Aktivierung von Erk und Akt

Um die Bedeutung eines intakten Aktinzytoskeletts für die Mechanotransduktion der MSC darzustellen, wurde die Aktivierung der Signalproteine Erk und Akt nach einer mechanischen Belastung der Integrinuntereinheiten unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts analysiert.

Die Abbildung 6A zeigt die Aktivierung von Erk nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts. Abbildung 6B zeigt die Ergebnisse durch die Belastung der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$ .

Bei einer Kultivierung der Zellen unter Zusatz von CytD wird die Aktivierung von Erk durch Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  nicht gehemmt, verglichen mit der Expression in den Kontrollzellen.

Bei einer Belastung der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$  kommt es hingegen unter Zusatz von CytD zu einer starken Hemmung der Aktivierung von Erk im Vergleich zu den Kontrollzellen und es zeigt sich damit ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Integrinuntereinheiten.

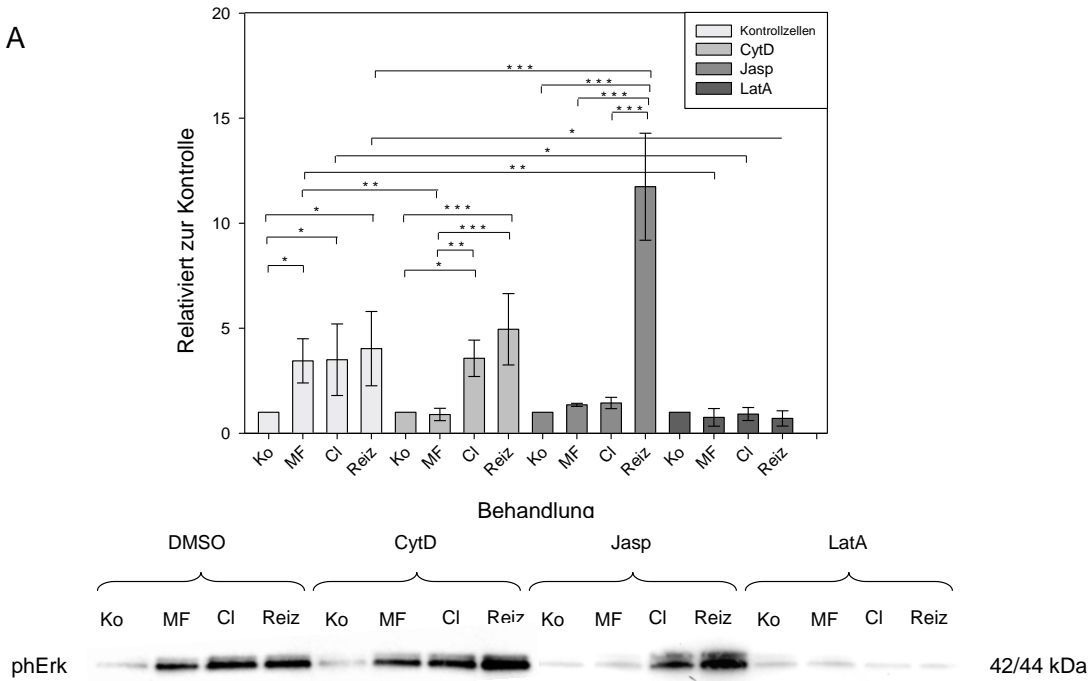
Zu einer eindeutigen Steigerung der Aktivierung von Erk, verglichen mit den Kontrollzellen, kommt es durch den mechanischen Reiz an der Untereinheit  $\beta 1$  unter Zusatz von Jasp.

Im Gegensatz dazu hemmt die Belastung der Untereinheit  $\alpha 5$  die Aktivierung von Erk bezogen auf die Kontrollzellen, wie dies auch unter CytD der Fall ist.

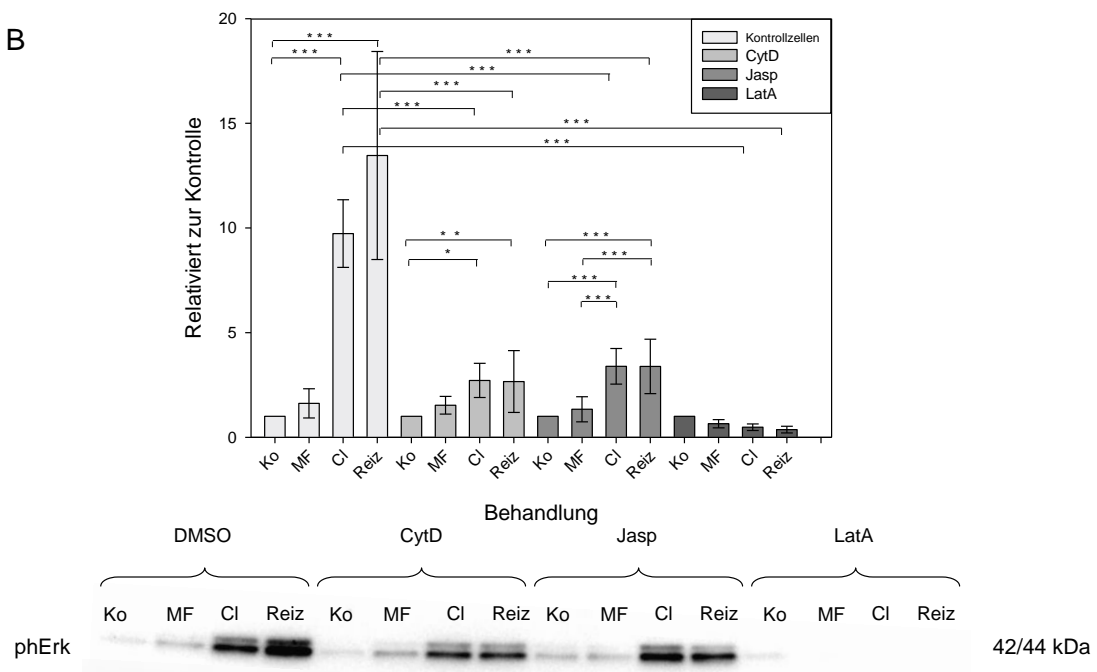
Unter Zusatz von LatA ist bei mechanischer Belastung der Untereinheit  $\beta 1$  eine deutliche Hemmung der Expression von aktiviertem Erk gegenüber den Kontrollzellen nachweisbar. Hierin ähneln sich die Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$ . Auch nach Belastung der Untereinheit  $\alpha 5$  ist die Expression von Erk in Gegenwart von LatA verglichen mit den Kontrollzellen stark gehemmt.

## Ergebnisse

A



B



**Abb. 6: Densitometrische Auswertung der Aktivierung von Erk nach Behandlung der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  (A) und  $\alpha 5$  (B) unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts mit repräsentativen Western Blots.**

## Ergebnisse

Die Abbildung 7A zeigt die Ergebnisse für die Aktivierung von Akt nach der Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts.

Die Ergebnisse für die Aktivierung von Akt nach der Belastung der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$  sind in der Abbildung 7B dargestellt.

Durch die Kultivierung der Zellen in Gegenwart von CytD zeigt sich verglichen zu den Kontrollzellen keine Änderung der Aktivierung von Akt nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$ .

Belastet man hingegen die Untereinheit  $\alpha 5$ , kommt es unter CytD zu einer deutlichen Hemmung der Aktivierung von Akt.

Bei einer Kultivierung der Zellen unter Zusatz von Jasp ist die Aktivierung von Akt durch den mechanischen Reiz an der  $\beta 1$  Untereinheit erhöht.

Im Gegensatz dazu kommt es nach der Belastung der Untereinheit  $\alpha 5$  auch unter Jasp zu einer deutlichen Hemmung der Aktivierung von Akt.

Durch die mechanische Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  unter Einsatz von LatA ist die Aktivierung von Akt verglichen mit den Kontrollzellen gehemmt.

Dieses Ergebnis ergibt ebenfalls die Belastung der Untereinheit  $\alpha 5$  unter LatA.

## Ergebnisse

Zur deutlicheren Darstellung dieser Ergebnisse zeigt Tabelle 5 den direkten Vergleich zwischen den Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  hinsichtlich deren Aktivierungen von Erk und Akt. Der Pfeil nach oben bzw. unten weist auf einen Anstieg bzw. Hemmung der Aktivierung des jeweiligen Signalproteins bezogen auf seine Kontrolle hin. Ein X bedeutet, dass es im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen keine Änderung der Aktivierung gibt, K steht für die Kontrollzellen.

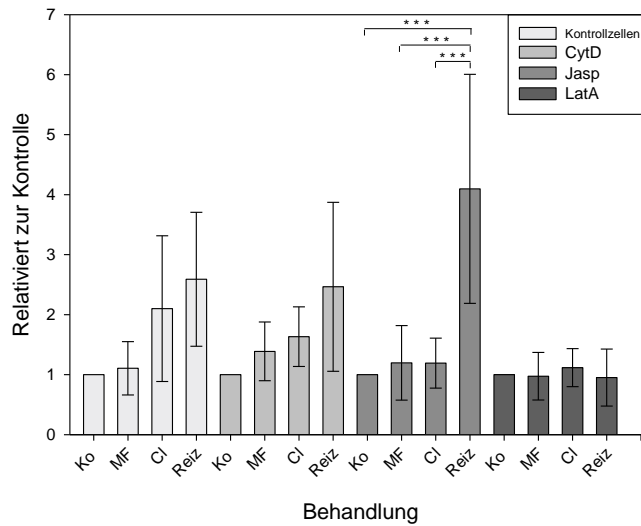
Signalprotein	Modulatoren	$\beta 1$	$\alpha 5$
Erk	Kontrollzellen	K	K
	CytD	X	↓
	Jasp	↑	↓
	LatA	↓	↓
Akt	Kontrollzellen	K	K
	CytD	X	↓
	Jasp	↑	↓
	LatA	X	↓

**Tab. 5: Zusammenfassung der Beeinflussung der Aktivierung der Signalproteine Erk und Akt unter Modulatoren.**

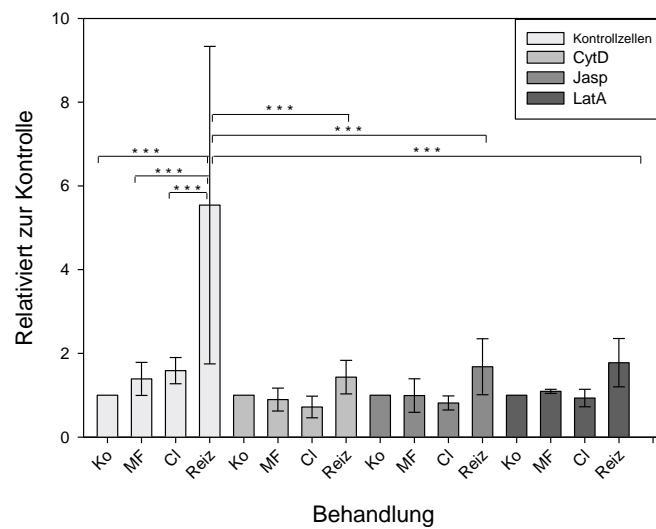


## Ergebnisse

A



B



**Abb. 7: Analyse der Aktivierung von Akt nach Behandlung der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  (A) und  $\alpha 5$  (B) unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts mittels BioPlex Assay.**

## Ergebnisse

### 4.4.2 Aktivierung von Src Tyrosin Kinasen

Um die Beeinflussung der für die intrazelluläre Signaltransduktion wichtigen Src Tyrosin Kinasen durch die mechanische Belastung der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  darzustellen, wurden die Aktivierungen mithilfe des BioPlex Array Reader ausgewertet. Berücksichtigt wurden die Kinasen Lck, Fgr, Fyn, Src, Yes, Lyn, Blk und Hck.

Betrachtet man die Effekte der mechanischen Belastung auf die Kontrollzellen, zeigt sich, dass die Kinase Lck durch eine mechanische Belastung an der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  verstärkt aktiviert wird.

Im Gegensatz dazu ist nach der mechanischen Belastung der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheit bei den Kontrollzellen keine Aktivitätssteigerung von Lck zu sehen.

Die Aktivierung der Kinase Fgr wird bei den Kontrollzellen weder durch eine mechanische Belastung der  $\beta 1$ , noch der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheit beeinflusst.

Bei der Fyn Kinase kommt es hingegen durch den mechanischen Reiz der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  der Kontrollzellen zu einer Aktivitätssteigerung.

Diese Steigerung von Fyn ist bei einer Belastung der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$  nicht feststellbar.

Die Src Kinase wird in den Kontrollzellen durch Belastung der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit nicht in ihrer Aktivität gesteigert.

Anders die mechanische Belastung an der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheit. Hier erfolgt durch die Belastung ein Anstieg der Aktivität von Src in den Kontrollzellen.

Die Tabelle 6 zeigt diese Ergebnisse im direkten Vergleich von  $\beta 1$  und  $\alpha 5$ .

Kontrollzellen	$\beta 1$	$\alpha 5$
Lck	↑	X
Fgr	X	X
Fyn	↑	X
Src	X	↑

**Tab. 6: Zusammenfassung der Beeinflussung der Aktivierung der Src Kinasen bei den Kontrollzellen.**

## Ergebnisse

Betrachtet man nun den Einfluss der Modulatoren des Aktinzytoskeletts auf die Aktivierung der Kinasen, so zeigt sich bei Lck, dass eine Kultivierung der Zellen unter Zusatz von CytD oder LatA und mit mechanischer Belastung der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit eine Hemmung der Aktivierung erzeugt (Abb. 8A).

Eine fehlende Hemmung der Aktivierung wird bei einer mechanischen Belastung der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheit bei Kultivierung unter Zugabe von CytD beobachtet (Abb. 8B). Es kommt hingegen zum Aktivitätsanstieg durch das Clustern.

Bei der Fgr Kinase kommt es bei der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit zu einer gesteigerten Aktivierung durch die mechanische Belastung bei einer Kultivierung der Zellen in Gegenwart von CytD und Jasp (Abb. 8C).

Im Unterschied zu der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  kommt es bei  $\alpha 5$  bei einer Kultivierung unter Zugabe von CytD zu einer Hemmung der Aktivierung von Fgr durch den mechanischen Reiz (Abb. 8D).

Unter den drei Modulatoren kommt es bei der Fyn Kinase zu einer Hemmung der Aktivierung durch den mechanischen Reiz an der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit (Abb. 8E).

Betrachtet man die Integrinuntereinheit  $\alpha 5$ , ist kein Einfluss der mechanischen Belastung unter Modulatoren auf die Aktivierung der Fyn Kinase feststellbar (Abb. 8F).

Der fehlende Einfluss der mechanischen Belastung unter den Modulatoren ist ebenfalls für die Aktivierung der Src Kinase bei der Belastung der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit zu beobachten (Abb. 8G).

Bei Belastung der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheit zeigen die Modulatoren CytD und Jasp auch keinen Einfluss auf die Aktivierung von Src. Bei einer Kultivierung unter Zugabe von LatA kommt es jedoch zu einer deutlichen Hemmung verglichen zu den Kontrollzellen (Abb. 8H).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Abhängigkeit von der Kinase die mechanische Belastung der Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  unterschiedliche Rollen in deren Aktivierungen spielen.

Für die Tyrosinkinasen Yes, Lyn, Blk und Hck konnte keine Beeinflussung der Aktivierungen durch mechanische Stimulation der  $\beta 1$  oder  $\alpha 5$  Integrinuntereinheiten bei gleichzeitiger Anwesenheit der verwendeten Modulatoren des Zytoskeletts festgestellt werden.

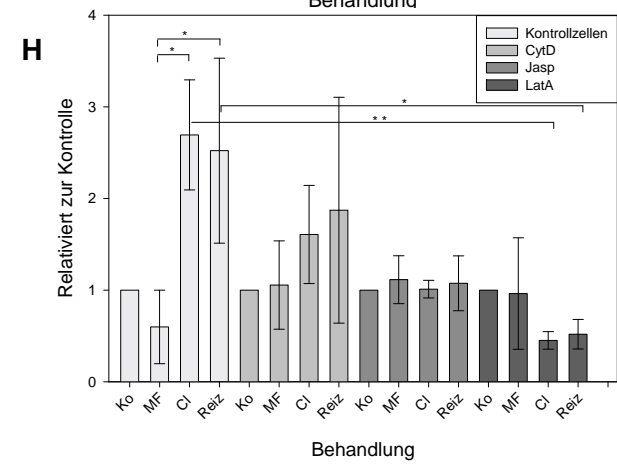
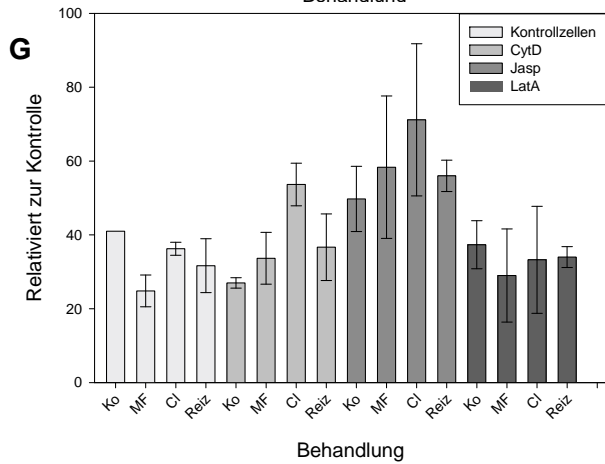
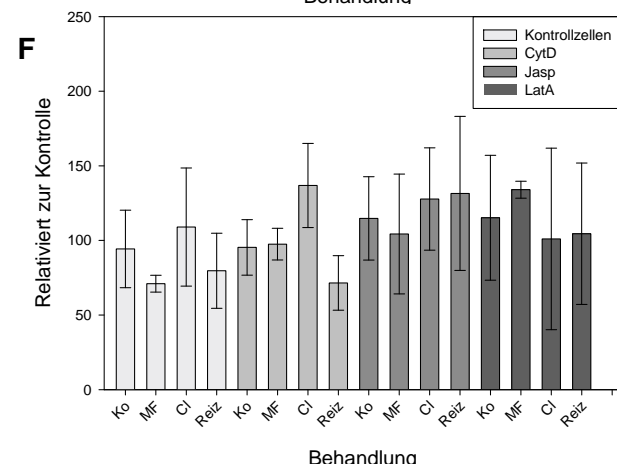
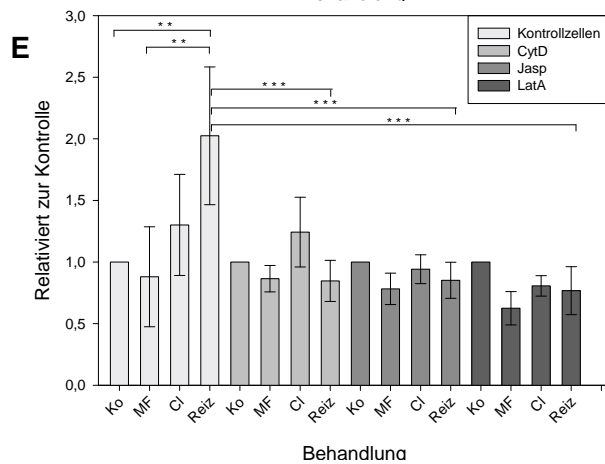
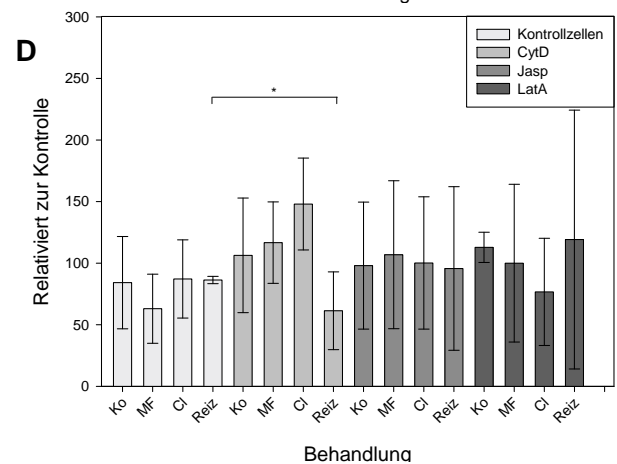
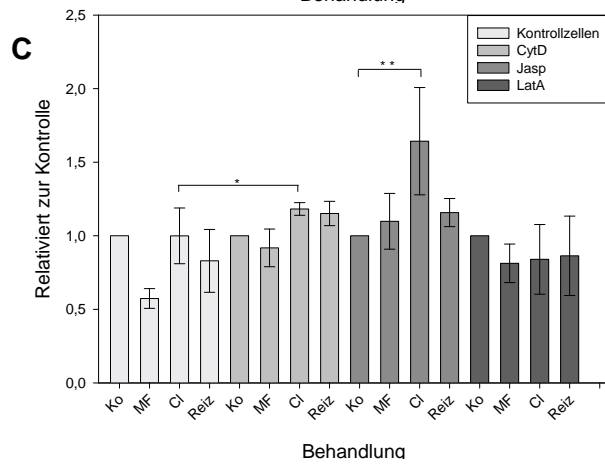
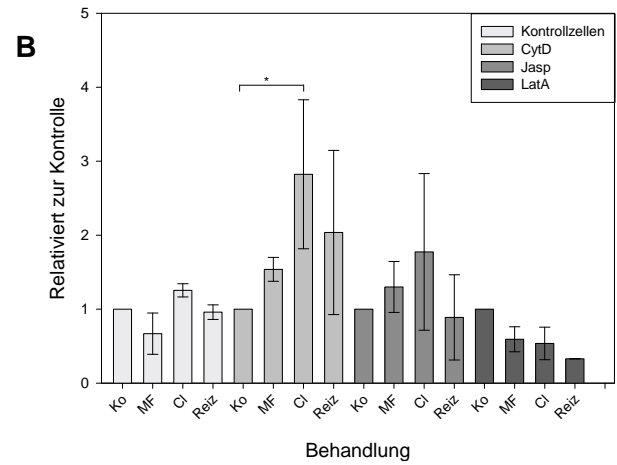
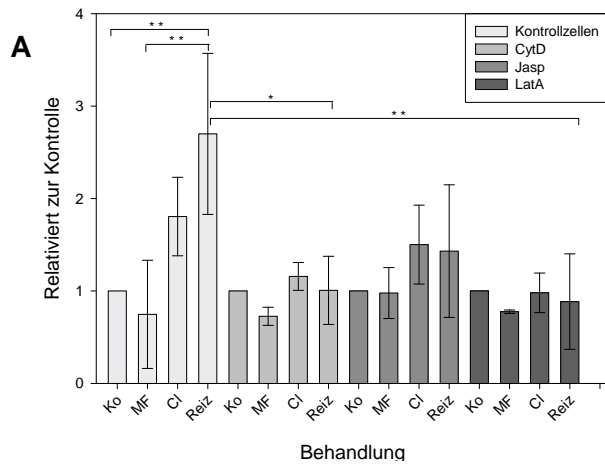
## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Beeinflussung der Tyrosin Kinasen sind in Tabelle 7 vergleichend dargestellt.

Kinase	Modulatoren	$\beta 1$	$\alpha 5$
Lck	Kontrollzellen	K	K
	CytD	↓	↑
	Jasp	X	X
	LatA	↓	X
Fgr	Kontrollzellen	K	K
	CytD	↑	↓
	Jasp	↑	X
	LatA	X	X
Fyn	Kontrollzellen	K	K
	CytD	↓	X
	Jasp	↓	X
	LatA	↓	X
Src	Kontrollzellen	K	K
	CytD	X	X
	Jasp	X	X
	LatA	X	↓

**Tab. 7: Zusammenfassung der Beeinflussung der Aktivierung der Src Kinasen unter Modulatoren.**

## Ergebnisse



## Ergebnisse

**Abb. 8: Bioplex Analyse der Aktivierung von Src Tyrosin Kinasen: Lck bei der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  (A) und  $\alpha 5$  (B); Fgr bei der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  (C) und  $\alpha 5$  (D); Fyn bei der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  (E) und  $\alpha 5$  (F); Src bei der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  (G) und  $\alpha 5$  (H).**

## Ergebnisse

### 4.5 Expression von Kollagen Typ 1 als funktionelle Antwort nach mechanischer Belastung an den Integrinuntereinheiten $\beta 1$ und $\alpha 5$ unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts

Die Expression von Kollagen Typ 1 als funktionelle Antwort auf eine Belastung der Integrinuntereinheiten unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts wurde mithilfe des Western Blots und dessen densitometrischer Auswertung untersucht (Abb. 9). Bei diesem Versuch wurde die Aufarbeitung 48h nach der Belastung der Integrinuntereinheiten durchgeführt.

Mechanische Belastung sowohl der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  als auch  $\alpha 5$  führte zu keiner erhöhten Expression von Kollagen Typ 1.

Die mechanische Belastung der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit bei der Kultivierung unter Zugabe von Jasp und LatA führt dagegen zu einer deutlich reduzierten Expression von Kollagen Typ 1.

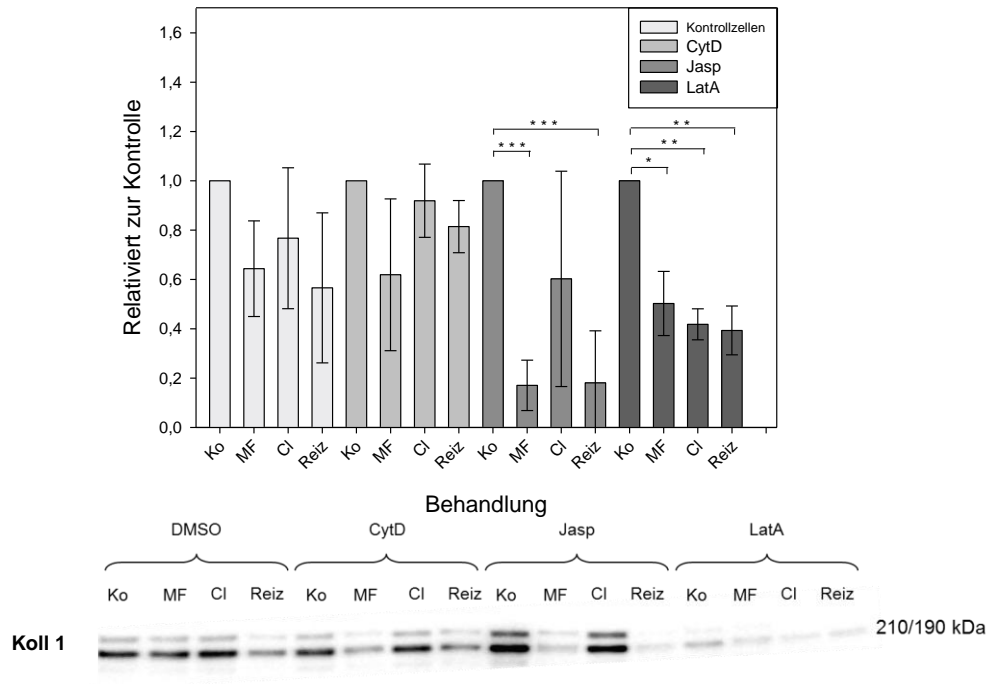
Nach der mechanischen Belastung der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheit kommt es auch bei einer Kultivierung der Zellen unter Zusatz der Modulatoren zu keiner Änderung der Expression von Kollagen Typ 1 verglichen mit den Kontrollzellen.

	Modulatoren	$\beta 1$	$\alpha 5$
Kollagen Typ 1	Kontrollzellen	K	K
	CytD	X	X
	Jasp	↓	X
	LatA	↓	X

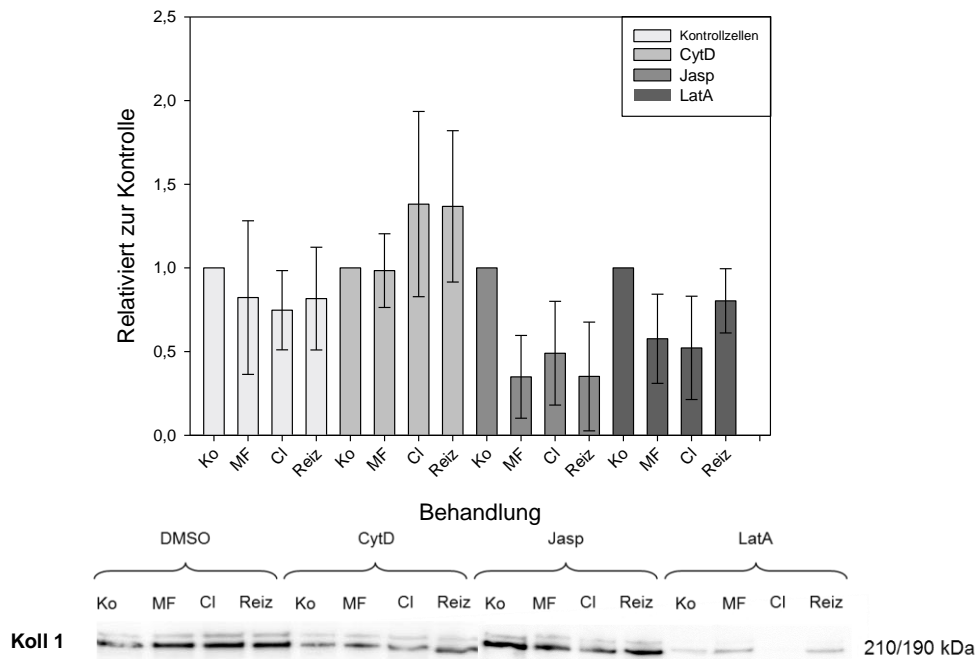
**Tab. 8: Zusammenfassung von Kollagen Typ 1 als funktionelle Antwort.**

## Ergebnisse

**A**



**B**



**Abb. 9: Expression von Kollagen Typ 1 als funktionelle Antwort nach Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  (A) und  $\alpha 5$  (B), Aufarbeitung der Zellen nach 48h.**



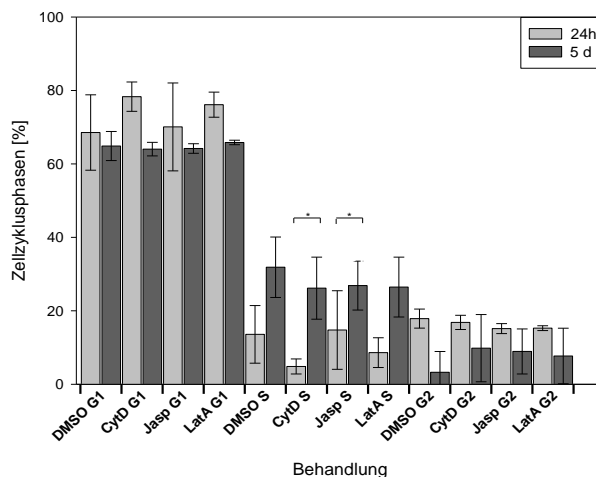
## Ergebnisse

### 4.6 Zellzyklusanalyse unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts

Nachdem die beschriebenen Effekte auf die Signalproteine gesehen wurden, stellte sich die Frage, ob der Zellzyklus der MSC ebenfalls durch die verwendeten Modulatoren beeinflusst wird.

Die Kultivierung mit den Modulatoren unter den verwendeten Konzentrationen führt zu keinem signifikanten Unterschied der detektierten Zellzyklusphasen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 10).

Es ergibt sich lediglich der Trend, dass im Vergleich zur Detektion nach 24 h, nach 5 d in der G1 und G2 Phase weniger Zellen detektiert werden und die Anzahl der Zellen in der S Phase zunehmen.



**Abb. 10: Zellzyklusphasen unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts.**

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es Kenntnisse über die Rolle des Aktinzytoskeletts bei der funktionellen Steuerung humaner mesenchymaler Stammzellen nach mechanischer Belastung der  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  Integrinuntereinheiten zu vertiefen. Um die Bedeutung des intakten Aktinzytoskeletts an der Mechanotransduktion zu beurteilen, wurden die hMSC in Gegenwart von polymerisierenden und depolymerisierenden Modulatoren des Aktinzytoskeletts kultiviert, die Integrinuntereinheiten einer mechanischen Belastung ausgesetzt und anhand unterschiedlicher Signalproteine die Wirkung dieser Belastung beurteilt.

Um die Zellen gezielt an den Integrinuntereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  mechanisch zu belasten, wurden paramagnetische Beads mit Antikörpern gegen diese Untereinheiten beschichtet. Nach Bindung der Beads an die Rezeptoren wurden die Zellen in einem inhomogenen Magnetfeld einem zyklischen Reiz ausgesetzt. Diese Belastung führt zu einer kleinen Distorsion der Zellmembran, welche elektronenmikroskopisch beobachtet werden kann. Doch auch bereits das Clustern durch die Anbindung der Beads an die Integrine stellt eine mechanische Belastung dar und beeinflusst die Aktivierung von Signalproteinen (Kasten et al. 2010).

Ein wesentlicher intrazellulärer Signalweg, der sowohl durch Integrine als auch durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird und biologische Antworten der Zellen induziert, ist der Ras-MEK-MAP-Kinase Signalweg. MAP-Kinasen, zu denen vor allem das Signalprotein Erk gehört, spielen dabei eine zentrale Rolle. Erk reguliert die Expression verschiedener Gene und beeinflusst so zelluläre Prozesse wie die Reaktion auf Stress, die Proliferation und die Differenzierung (Johnson und Lapadat 2002).

Wir konnten zeigen, dass Erk transient sowohl durch mechanische Reizung der  $\beta 1$  als auch der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheiten aktiviert wurde.

Bei Belastung von  $\alpha 5$  scheint es jedoch zu einer Verzögerung zu kommen und eine Aktivierung von Erk durch  $\alpha 5$  deutlich ineffizienter zu sein.

Nach einer Inkubation mit der depolymerisierenden Substanz Cytochalasin D, wodurch das Aktinzytoskeletts vollkommen zerstört wird, wurde die Aktivierung von Erk durch mechanische Belastung von  $\beta 1$  nicht beeinflusst. Damit konnte ein früherer Befund bestätigt werden (Müller et al. 2013). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass alternative Signalwege ohne Beteiligung des Zytoskeletts eine Aktivierung von Erk ermöglichen. Durch Zerstörung des Zytoskeletts könnte eine Hemmung von FAK erfolgen, jedoch

andere Signalwege wie die Aktivierung der MAPK über Shc aktiv bleiben (Barberis et al. 2000; Lai und Pawson 2000). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation von Erk durch CytD gehemmt wurde (Kawamura et al. 2003).

Unsere Ergebnisse konnten interessanterweise nachweisen, dass die Belastung der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$  einen anderen Effekt hatte. In diesem Fall führte die Behandlung mit CytD zu einem deutlichen Abfall der Aktivierung von Erk. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Signalvorgänge von  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  nicht identisch sind. Für die Aktivierung von Erk über  $\alpha 5$  scheint das intakte Zytoskelett eine Voraussetzung zu sein, z. B. für eine Verankerung von aktivierten Signalproteinen, was nach Integrinreiz gezeigt wurde (Schmidt et al. 1998).

Latrunculin A ist ebenfalls eine destabilisierende und depolymerisierende Substanz, welche die Umbauprozesse des Aktinzytoskeletts unterdrückt (Coué et al. 1987). Nach Inkubation mit LatA konnten wir eine deutliche Veränderung der Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch beobachten. So rundet sich die Zelle ab und man findet ein größtenteils zerstörtes Aktinzytoskelett. Anders als bei CytD führte die mechanische Stimulation der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  als auch von  $\alpha 5$  zu einer starken Hemmung der Aktivierung von Erk. Die durch LatA erzeugten drastischen Veränderungen der Zellform und Zellstruktur scheinen zu einem Verlust der Mechanotransduktion über die beiden Integrinuntereinheiten zu führen.

Jasplakinolid hemmt die Umbauprozesse und Integrität des Aktinzytoskeletts durch seine polymerisierende und stabilisierende Wirkung (Bubb et al. 2000). In der Immunfluoreszenz sind die verdickten Aktinbündel erkennbar. Auch bei der Modulation des Zytoskeletts durch Jasplakinolid zeigten sich Unterschiede in der Wirkung des mechanischen Reizes von  $\beta 1$  im Vergleich zu  $\alpha 5$  auf die Aktivierung von Erk. Die verstärkte Polymerisierung des Aktinzytoskeletts induzierte eine verstärkte Aktivierung von Erk durch mechanische Belastung von  $\beta 1$ . In einem anderen Kontext konnte gezeigt werden, dass Jasplakinolid in der Lage war, die durch CytD gehemmte nukleäre Translokation von Erk aufzuheben (Kawamura et al. 2003).

Anders als bei der Stimulation von  $\beta 1$ , führte die Belastung von  $\alpha 5$  unter Jasp in unseren Versuchen zu einer deutlichen Hemmung der Aktivierung von Erk. Die Aktivierung von Erk über die Untereinheit  $\alpha 5$  ist offensichtlich von einem pharmakologisch unbeeinflussten Aktinzytoskelett abhängig.

Das Signalmolekül Akt ist eine Serin/Threonin Kinase und Bestandteil des PI3K-Akt Signalwegs. Dieser Signalweg reguliert verschiedene biologische Prozesse, wie

Proliferation, Überleben und Migration (Cantley 2002; Brazil et al. 2004; Jiang und Liu 2008).

Im Rahmen des Integrinsignalwegs spielt die Interaktion von FAK mit der PI3-K eine Rolle. Aktivierung von FAK verankert PI3-K in den Fokalkontakten, was zur Aktivierung von Akt führt (Legate et al. 2009). Unsere Versuche zur Aktivierung von Akt unter dem Einfluss der mechanischen Belastung von  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  zeigten ähnliche Ergebnisse, wie wir für die Aktivierung von Erk beobachten konnten. Es zeigte sich eine transiente Aktivierung, wobei beide Integrinuntereinheiten einen identischen Verlauf zeigten. Diese Befunde zeigen, dass auch der PI3K-Akt Signalweg durch mechanische Integrinbelastung aktiviert und durch beide Integrinuntereinheiten gleichermaßen kontrolliert wird. Es ist bemerkenswert, dass auch in den Versuchen unter dem Einfluss der Zytoskelettmodulatoren die identischen Effekte beobachtet wurden, wie für die Aktivierung von Erk nachgewiesen. Unter CytD zeigte sich ein unterschiedlicher Effekt für die Stimulierung von  $\beta 1$  und  $\alpha 5$ , LatA führte in beiden Fällen zur Hemmung von Akt und Jasp zeigte wieder unterschiedliche Effekte für die Aktivierung von Akt durch  $\beta 1$  und  $\alpha 5$ . Die Aktivierung von Erk und Akt scheint demnach eng miteinander verknüpft zu sein. Es sind verschiedene Wechselwirkungen zwischen dem PI3K-Akt Signalweg und MAP-K Signalweg bekannt. In der Regel führt die Hemmung eines Faktors des einen Signalwegs zur Aktivierung eines Signalmoleküls des anderen Signalwegs oder umgekehrt (Serra et al. 2011). So führt auch eine Aktivierung von Erk zu einer niedrigeren Aktivität von Akt (Irie et al. 2005). Wir konnten hier zeigen, dass Änderung der Aktivierungen durch Zytoskelettmodulatoren zu synergistischen Effekten bei Erk und Akt führen.

NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der im inaktiven Zustand im Zytoplasma an I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B) gebunden vorliegt. Durch extrazelluläre Stimulation kann I $\kappa$ B phosphoryliert werden und sich abspalten, sodass NF $\kappa$ B in den Kern wandern kann und dort die Gentranskription für unter anderem Cytokine und Adhäsionsmoleküle reguliert. NF $\kappa$ B wirkt wie ein koordinierendes Element bei Antworten auf Stress, Entzündung und Infektion und spielt zudem beim antiapoptotischen Signalweg eine wichtige Rolle. NF $\kappa$ B kann schnell reguliert werden (Bottex-Gauthier et al. 2002; Wang et al. 2002).

Es wurde bereits beobachtet, dass mechanischer Stress über Integrine zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führen kann (Chiquet et al. 2003).

Unsere Ergebnisse zeigen die besondere Rolle der Integrinuntereinheit  $\beta 1$ . Über die Belastung von  $\beta 1$  erfolgte eine deutlich effektivere und schnellere Aktivierung des NF $\kappa$ B. Dessen Aktivierung verläuft demnach über  $\beta 1$ , während  $\alpha 5$  eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Möglich wäre auch, dass die Integrinuntereinheit  $\beta 1$  deutlich sensibler auf die mechanische Belastung reagiert und die Reizschwelle der Untereinheit  $\alpha 5$  höher liegt. Für diese Vermutung spricht der Trend, der durch die Belastung von  $\alpha 5$  erreicht wurde. Der Verlauf ähnelt dem der Untereinheit  $\beta 1$  sehr, ist jedoch schwächer. Um diese Vermutung zu überprüfen, könnte man  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  verschiedenen starken Belastungen aussetzen.

Der Verlauf der Expression von I $\kappa$ B folgt dem des NF $\kappa$ B. Es kommt lediglich nach einem gewissen Zeitintervall zu einem Abfall der Expression.

STAT2 (signal transducer and activator of transcription 2) ist ein Protein aus der STAT-Familie. Diese intrazellulären Transkriptionsfaktoren werden über die JAK (Janus Kinase) phosphoryliert und damit aktiviert und beeinflussen zelluläre Prozesse wie die Apoptose, Differenzierung und Proliferation (Vinkemeier et al. 1998).

Die Expression von STAT2 wurde in unseren Versuchen weder durch die Belastung der Integrinuntereinheit  $\beta 1$ , noch durch  $\alpha 5$  beeinflusst. Pan et al. (1999) zeigten, dass in Kardiomyozyten eine mechanische Belastung zu einer Aktivierung von STAT1 sowie STAT3 führt, jedoch ebenfalls nicht von STAT2. Yi et al. (2012) fanden heraus, dass STAT2 in hcMSC (human clonal MSC) durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aktiviert wird und in die immunmodulatorische Aktivität der MSC involviert ist. Dies deutet darauf hin, dass STAT2 vor allem durch Cytokine aktiviert wird und nicht über Integrin vermittelte Adhäsionsmechanismen.

Desweiteren haben wir die Src-Tyrosin-Kinasen untersucht, welche bei der Integrin vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Jede Src-Kinase besteht aus sechs Domänen. Um einen aktiven Signalkomplex Src-FAK zu erhalten, ist eine Phosphorylierung der FAK durch Integrine nötig, woraufhin eine Kinase der Src-Familie an FAK bindet und über weitere Phosphorylierungen ein aktiver Komplex entsteht (Calalb et al. 1995; Parsons 2003). In gesunden Zellen katalysieren die Src-Kinasen intrazelluläre Signalwege, welche das Zellwachstum und die Adhäsionsstärke und damit die Zellmigration beeinflussen (Frame 2002). Bei einem Mangel an Src-Kinasen kommt es zu einer mangelnden Aktivierung von FAK und damit unter anderem zu einer gestörten Zellmigration (Klinghoffer et al. 1999).

In unseren Auswertungen wurden acht der elf in humanen Zellen bekannten Kinasen der Src-Familie berücksichtigt. Lck, Fyn, Fgr, Src, Yes, Lyn, Blk und Hck, wobei lediglich für die ersten vier Kinasen deutliche Änderungen festgestellt werden konnten.

Lck befindet sich hauptsächlich in den T-Zellen und scheint für die Aktivierung von Fyn eine wichtige Rolle zu spielen. Deren Interaktionen regulieren die Aktivierung zellulärer Prozesse (Filipp et al. 2003).

Ein Anstieg der Aktivierung von Lck wurde durch eine mechanische Belastung der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit der Kontrollzellen beobachtet, während eine Belastung von  $\alpha 5$  keine Veränderungen zeigte. Unter den Modulatoren hingegen führte auch eine Belastung von  $\alpha 5$  zu einem Anstieg der Aktivierung. Eine Inkubation mit CytD führte bei  $\beta 1$  zu einem Abfall der Aktivierung, während es bei  $\alpha 5$  zu einem Anstieg kam. Interessanterweise ist dies jedoch nur bei einer Clusterung der  $\alpha 5$  Untereinheit der Fall. Eine statische Belastung scheint hier den adäquateren Reiz darzustellen. Es wäre also möglich, dass die von uns ausgeübte zyklische mechanische Belastung nicht den richtigen Reiz zur Aktivierung der Lck Kinase über  $\alpha 5$  darstellt.

Zur Aktivierung von Lck über  $\beta 1$  scheint ein intaktes Zytoskelett notwendig zu sein, da es neben CytD auch bei LatA zu einer Hemmung der Aktivierung kommt.

Fyn spielt zum einen gemeinsam mit Lck eine wichtige Rolle in den T-Zell Signalwegen, zum anderen beeinflusst es Adhäsionssignale sowie die Zellteilung (Resh 1998).

Die Beeinflussung von Fyn verhält sich sehr ähnlich wie Lck. Bei den Kontrollzellen führte eine Belastung der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit zu einem Anstieg der Aktivierung von Fyn. Unter den Modulatoren kam es bei Belastung der  $\beta 1$  Untereinheit ebenfalls zu einer Hemmung der Aktivierung. So scheint auch in den hMSc eine Aktivierung von Lck durch die Integrine zu einer Aktivierung von Fyn zu führen. Interessant wäre es zu überprüfen, ob die Aktivierung von Fyn wie in den T-Zellen über Lck erfolgt, oder über die  $\beta 1$  Untereinheit.

Eine Änderung der Aktivierung über  $\alpha 5$  konnte nicht beobachtet werden.

Es zeigte sich bei unseren Ergebnissen für die Kinase Fgr keine Änderung der Aktivierung durch eine Belastung der  $\beta 1$ , als auch der  $\alpha 5$  Integrinuntereinheiten der Kontrollzellen. In der Literatur ist lediglich eine Aktivierung über die Integrinuntereinheit  $\beta 2$  bekannt (Gene ID: 2268).

Bei einem veränderten Zytoskelett durch die Modulatoren kam es hingegen zu einer Beeinflussung. Hierbei schien jedoch für die Untereinheit  $\beta 1$  die statische Belastung durch das Clustern der adäquatere Reiz für einen Anstieg der Aktivierung zu sein. Bei der Untereinheit  $\alpha 5$  kam es dagegen durch den mechanischen Reiz unter CytD zu einer Hemmung der Aktivierung von Fgr.

Aktiviertes Src beeinflusst die Zelladhäsion, Transkription von Genen, Proliferation und die Angiogenese (Zan et al. 2011). Erhöhte Aktivitätslevel sind vermutlich mit Tumorwachstum assoziiert (Wheeler et al. 2009).

Eine Belastung der  $\beta 1$  Untereinheit beeinflusste die Aktivierung von Src nicht und auch ein verändertes Zytoskelett führte zu keiner Änderung über  $\beta 1$ .

Die Belastung der  $\alpha 5$  Untereinheiten der Kontrollzellen führte dagegen zu einem Anstieg von Src. Durch die starke Zerstörung des Zytoskeletts durch LatA und nachfolgender mechanischer Belastung kam es zu einer Hemmung der Aktivierung.

Bemerkenswert ist, dass der Anstieg bzw. Abfall der Aktivierungen der Src Kinasen nicht dem zuvor beobachteten Muster der Signalproteine Erk und Akt folgt.

Ein normales intaktes Zytoskelett scheint für die Src Kinasen weniger bedeutsam zu sein. Es zeigte sich, dass der Einfluss der Modulatoren auf die Aktivierung verschiedener Kinasen auch bei Stimulation derselben Intergrinuntereinheit unterschiedlich ausfällt. Einzig zwischen Lck und Fyn konnten synergistische Effekte beobachtet werden.

In der Literatur wurde eine Interaktion zwischen Shc und den Kinasen Src, Fyn und Lyn beschrieben (Weng et al. 1994). Es stellt sich also die Frage, ob die von uns gemessenen Aktivitäten der Kinasen direkt über die mechanische Belastung der Integrinuntereinheiten oder indirekt über Shc oder andere Signalwege beeinflusst wurden.

Als funktionelle Antwort auf die Belastung der Integrine wurde die Expression von Kollagen Typ 1 bestimmt. Kollagen Typ 1 besteht aus zwei  $\alpha 1$ - und einer  $\alpha 2$ -Kette, welche intrazellulär an den Ribosomen synthetisiert werden. Diese werden dann in den extrazellulären Raum transportiert, wo sich die Ketten zu Fibrillen anlagern und über kovalente Querverbindungen ihre Stabilität erhalten. Kollagen Typ 1 ist in vielen krafttragenden Geweben ein Hauptbestandteil wie beispielsweise in der Haut, Sehnen und Knochen (Kühn 1974).

Bei der Belastung der Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  der Kontrollzellen konnten keine Änderungen der Expression beobachtet werden. Es zeigte sich lediglich der Trend, dass es unter der mechanischen Belastung zu einer Abnahme der Expression kam. Diese Beobachtung widerspricht allerdings den Ergebnissen in der Literatur für Kollagen Typ 1. So kommt es bei Tendozyten durch eine mechanische Belastung der gesamten Zelle zu einem Anstieg der Expression von Kollagen Typ 1, wobei ein zyklischer Stress zu höheren Levels führte, als eine kontinuierliche Belastung (Huisman et al. 2014). Von Tanaka et al. (2013) wurde gezeigt, dass über das  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin eine erhöhte Expression von Prokollagen in dedifferenzierten Chondrozyten induziert wird.

Insgesamt ist in der Literatur jedoch wenig über die Mechanotransduktion für die Expression von Kollagen Typ 1 in den MSC bekannt. Passend hierzu beschrieben Kook et al. (2009; 2011) für Fibroblasten, dass die Expression von Kollagen Typ 1 als Antwort auf mechanische Kräfte je nach mechanischem Stimulus und den experimentellen Voraussetzungen variiert. Der genaue Signalweg der Mechanotransduktion für Kollagen Typ 1 sei jedoch noch unklar.

Über den Einfluss der Modulatoren ist in der Literatur ebenfalls wenig bekannt. Hubchak (2003) konnte feststellen, dass CytD und LatA in Mesangiumzellen zu einer Verringerung der Expression des Kollagen Typ 1 führen. Unsere Versuche konnten dieses Ergebnis für LatA bestätigen, während es unter der Kultivierung von CytD jedoch zu keiner deutlichen Abnahme der Expression kam. In unseren Versuchen erfolgte eine Abnahme unter der Kultivierung mit Jasp.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in unseren Versuchen die zyklische Belastung der  $\beta 1$  Integrinuntereinheit bei einem verstärkten oder vollkommen zerstörten Aktinzytoskelett zu einer deutlichen Abnahme der Expression von Kollagen Typ 1 führte, während die Belastung der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$  unter den Modulatoren lediglich einen ähnlichen Trend wie bei  $\beta 1$  ergab.

Für die Induzierung der Kollagenexpression ist neben der Reizung des Integrins auch eine Verformung der Zelle und ein intaktes Zytoskeletts notwendig.

Abschließend haben wir untersucht, inwieweit die Zellzyklusphasen der MSC durch die verwendeten Modulatoren beeinflusst werden. Verglichen wurden dabei die Zellzahlen pro Zellzyklusphase nach 24 h und 5 d nach der Kultivierung mit den Modulatoren. Es kam zu keiner weiteren Abnahme der Zellzahlen nach 5 d. Es zeigte sich der Trend,



## Diskussion

dass nach 5 d in der G1 und G2 Phase weniger Zellen detektiert wurden und die Anzahl der Zellen in der S Phase zunahm. Dies deutet auf eine Erholung der Zellen hin und die MSC scheinen den Zellzyklus schneller zu durchlaufen.

## 6 Zusammenfassung

1. Die Ergebnisse zeigten, dass die Integrine  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  unterschiedliche Aktivierungen von Signaltransduktionsmolekülen bei mechanischer Belastung hervorrufen können.
2. Die zeitliche Aktivierung von Erk erfolgte deutlich schneller durch eine Belastung des Integrins  $\beta 1$ , als durch das Integrin  $\alpha 5$ , während für die Aktivierung von Akt hinsichtlich der beeinflussten Integrine keine Unterschiede gesehen werden konnten.
3. NF $\kappa$ B wurde schnell und langanhaltend durch die Mechanotransduktion über Integrin  $\beta 1$  aktiviert. Die Mechanotransduktion über das Integrin  $\alpha 5$  scheint von untergeordneter Bedeutung für die Aktivierung von NF $\kappa$ B zu sein.
4. Eine Aktivierung von I $\kappa$ B erfolgte durch das Integrin  $\beta 1$  etwas verzögert. Auch über das Integrin  $\alpha 5$  ist eine geringe Aktivierung zu sehen.
5. STAT2 wurde weder durch eine Belastung des Integrins  $\beta 1$ , noch durch  $\alpha 5$  aktiviert.
6. Die Ergebnisse belegten außerdem, dass das Aktinzytoskelett in Abhängigkeit vom Integrin unterschiedlich in die Signaltransduktion eingebunden ist.
7. So führte ein durch Jasp verstärktes Zytoskelett zu einem Anstieg der Aktivierung von Erk und Akt bei Belastung des Integrins  $\beta 1$ . Bei Belastung des Integrins  $\alpha 5$  führte ein verändertes Zytoskelett hingegen zu einem Abfall von Erk und Akt. Ein intaktes Zytoskelett ist für die Mechanotransduktion über  $\alpha 5$  notwendig.
8. Auch die Aktivierung der Src Kinasen ist von einem intakten Zytoskelett abhängig. Lediglich die Aktivität der Fgr Kinase ließ sich durch Belastung des Integrins  $\beta 1$  unter CytD und Jasp steigern, sowie die Lck Kinase durch Belastung des Integrins  $\alpha 5$  unter CytD.
9. Für die integrininduzierte Kollagensynthese ist ebenfalls ein intaktes Zytoskelett nötig.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Arp	Aktin-related Protein
Cl	Clustern
CytD	Cytochalasin D
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
FAK	Fokale Adhäsions Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
Hc	Human clonal
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor of κB
IMDM	Isocove's modified Dulbecco's medium
ISCT	International Society for Cellular Therapy
JAK	Janus Kinase
Jasp	Jasplakinoide
Ko	Kontrolle
LatA	Latrunculin A
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MAP-K	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MF	Magnetfeld
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NFκB	Nuclear factor κB
NPF	Nuclear-promoting-factor
PBS	Phosphate-buffered saline
PGE	Prostaglandine
PTK	Protein Tyrosin Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
STAT	Signal transducer and activator of transcripton
TNF	Tumornekrosefaktor

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologie der MSC unter Inhibitoren des Aktinzytoskeletts. Lichtmikroskopische Aufnahmen, 32x Objektiv.....	23
Abb. 2: Darstellung von $\beta 1$ und $\alpha 5$ Integrinuntereinheiten und Aktin unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts der MSC. Konfokale Lasermikroskopie Aufnahmen, 63x Öljektiv.....	25
Abb. 3: Aktivierung von Erk nach Belastung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ (A) und $\alpha 5$ (B). ....	27
Abb. 4: Aktivierung von Akt nach Belastung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ (A) und $\alpha 5$ (B). ....	29
Abb. 5: Expression von NF $\kappa$ B nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ (A) und $\alpha 5$ (B); Expression von I $\kappa$ B nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ (C) und $\alpha 5$ (D); Expression von STAT2 nach mechanischer Belastung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ (E) und $\alpha 5$ (F). ....	31
Abb. 6: Densitometrische Auswertung der Aktivierung von Erk nach Behandlung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ (A) und $\alpha 5$ (B) unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts mit repräsentativen Western Blots. ....	33
Abb. 7: Analyse der Aktivierung von Akt (S4738) nach Behandlung der Integrinuntereinheiten $\beta 1$ (A) und $\alpha 5$ (B) unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts mittels BioPlex Assay. ....	36
Abb. 8: Bioplex Analyse der Aktivierung von Src Tyrosin Kinasen: Lck bei der Integrinuntereinheit $\beta 1$ (A) und $\alpha 5$ (B); Fgr bei der Integrinuntereinheit $\beta 1$ (C) und $\alpha 5$ (D); Fyn bei der Integrinuntereinheit $\beta 1$ (E) und $\alpha 5$ (F); Src bei der Integrinuntereinheit $\beta 1$ (G) und $\alpha 5$ (H). ....	41
Abb. 9: Expression von Kollagen Typ 1 als funktionelle Antwort nach Belastung der Integrinuntereinheit $\beta 1$ (A) und $\alpha 5$ (B), Aufarbeitung der Zellen nach 48h. ....	43
Abb. 10: Zellzyklusphasen unter Modulatoren des Aktinzytoskeletts. ....	44

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Laufpuffer .....	18
Tab. 2: Blockmilch .....	19
Tab. 3: Transferpuffer .....	19
Tab. 4: Waschpuffer.....	19
Tab. 5: Zusammenfassung der Beeinflussung der Aktivierung der Signalproteine Erk und Akt unter Modulatoren. ....	35
Tab. 6: Zusammenfassung der Beeinflussung der Aktivierung der Src Kinasen bei den Kontrollzellen.....	37
Tab. 7: Zusammenfassung der Beeinflussung der Aktivierung der Src Kinasen unter Modulatoren. ....	39
Tab. 8: Zusammenfassung von Kollagen Typ 1 als funktionelle Antwort. ....	42

## 10 Literaturverzeichnis

- Aguda AH, Burtnick LD, Robinson RC (2005) The state of the filament. *EMBO Rep.* 6: 220–226.
- Andavan GSB, Lemmens-Gruber R (2010) Cyclodepsipeptides from marine sponges: natural agents for drug research. *Mar. Drugs* 8: 810–834.
- Ayscough KR, Stryker J, Pokala N, Sanders M, Crews P, Drubin DG (1997) High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* 137: 399–416.
- Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH (2007) Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem. Res.* 32: 353–362.
- Barberis L, Wary KK, Fiucci G, Liu F, Hirsch E, Brancaccio M, Altruda F, Tarone G, Giancotti FG (2000) Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J. Biol. Chem.* 275: 36532–36540.
- Barkauskas CE, Crounce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, Randell SH, Noble PW, Hogan BLM (2013) Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* 123: 3025–3036.
- Bartholomew A, Patil S, Mackay A, Nelson M, Buyaner D, Hardy W, Mosca J, Sturgeon C, Siatskas M, Mahmud N, Ferrer K, Deans R, Moseley A, Hoffman R, Devine SM (2001) Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. *Hum. Gene Ther.* 12: 1527–1541.
- Bernheim-Groswasser A, Wiesner S, Golsteyn RM, Carlier M, Sykes C (2002) The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417: 308–311.
- Bieling P, Laan L, Schek H, Munteanu EL, Sandblad L, Dogterom M, Brunner D, Surrey T (2007) Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* 450: 1100–1105.
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E (2004) Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118: 635–648.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 7: 14.
- Bottex-Gauthier C, Pollet S, Favier A, Vidal DR (2002) Les facteurs de transcription Rel/NF-kappa B: rôle complexe dans les régulations cellulaires. *Pathol. Biol.* 50: 204–211.
- Boudreau NJ, Varner JA (2004) The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 279: 4862–4868.
- Brazil DP, Yang Z, Hemmings BA (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 29: 233–242.
- Brett JG, Tannenbaum J (1985) Cytochalasin D-induced increase in actin synthesis and content in a variety of cell types. *Cell Biol. Int. Rep.* 9: 723–730.
- Broekaert D (1993) Cytoskeletal polypeptides: cell-type specific markers useful in investigative otorhinolaryngology. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 27: 1–20.

- Brown SS, Spudich JA (1979) Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. *J. Cell Biol.* 83: 657–662.
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI (1994) Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell. Biochem.* 56: 283–294.
- Bubb MR, Spector I, Beyer BB, Fosen KM (2000) Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* 275: 5163–5170.
- Buck C, Albelda S, Damjanovich L, Edelman J, Shih DT, Solowska J (1990) Immunohistochemical and molecular analysis of beta 1 and beta 3 integrins. *Cell Differ. Dev.* 32: 189–202.
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *J. Mol. Cell. Biol.* 15: 954–963.
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655–1657.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9: 641–650.
- Caplan AI (1994) The mesengenic process. *Clin. Plast. Surg.* 21: 429–435.
- Caplan AI (2000) Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 379: 67–70.
- Caplan AI (2005) Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 11: 1198–1211.
- Caplan AI, Correa D (2011) The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9: 11–15.
- Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 98: 1076–1084.
- Carlier M, Le Clainche C, Wiesner S, Pantaloni D (2003a) Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays* 25: 336–345.
- Carlier M, Wiesner S, Le Clainche C, Pantaloni D (2003b) Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro. *C. R. Biol.* 326: 161–170.
- Carlier MF, Pantaloni D (1997) Control of actin dynamics in cell motility. *J. Mol. Biol.* 269: 459–467.
- Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Flück M (2003) How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol.* 22: 73–80.
- Conget PA, Minguell JJ (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181: 67–73.
- Cossart P (2000) Actin-based motility of pathogens: The Arp2/3 complex is a central player. *Cell. Microbiol.* 2: 195–205.
- Couchman JR, Austria MR, Woods A (1990) Fibronectin-cell interactions. *J. Invest. Dermatol.* 94: 7S–14S.
- Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED (1987) Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* 213: 316–318.
- Crapnell K, Blaesius R, Hastings A, Lennon DP, Caplan AI, Bruder SP (2013) Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening. *Exp. Cell Res.* 319: 1409–1418.

- Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26: 2287–2299.
- Damsky C, Tremble P, Werb Z (1992) Signal transduction via the fibronectin receptor: do integrins regulate matrix remodeling? *Matrix Suppl.* 1: 184–191.
- Danen EHJ (2000) Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects - Madame Curie Bioscience Database - NCBI Bookshelf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6259/> (11/03/2014).
- Danen EHJ (2005) Integrins: regulators of tissue function and cancer progression. *Curr. Pharm. Des.* 11: 881–891.
- Danen EHJ (2009) Integrin proteomes reveal a new guide for cell motility. *Sci. Signal* 2: 58.
- Danen EHJ, Sonnenberg A (2003) Integrins in regulation of tissue development and function. *J. Pathol.* 201: 632–641.
- Danen EHJ, Sonneveld P, Brakebusch C, Fassler R, Sonnenberg A (2002) The fibronectin-binding integrins  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha v \beta 3$  differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 159: 1071–1086.
- Danen EHJ, van Rheenen J, Franken W, Huveneers S, Sonneveld P, Jalink K, Sonnenberg A (2005) Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J. Cell Biol.* 169: 515–526.
- Dennis JE, Caplan AI (1996) Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Connect. Tissue Res.* 35: 93–99.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838–3843.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324: 1673–1677.
- Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY (2012) Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle* 11: 377–383.
- Dominguez R (2009) Actin filament nucleation and elongation factors-structure-function relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44: 351–366.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.
- Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83: 433–473.
- Filipp D, Zhang J, Leung BL, Shaw A, Levin SD, Veillette A, Julius M (2003) Regulation of Fyn through translocation of activated Lck into lipid rafts. *J. Exp. Med.* 197: 1221–1227.
- Fletcher DA, Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463: 485–492.



- Frame MC (2002) Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 114–130.
- Fuchs E, Chen T (2013) A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* 14: 39–48.
- Ghazanfari S, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA (2009) Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and their differentiation to smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388: 601–605.
- Glossop JR, Cartmell SH (2009) Effect of fluid flow-induced shear stress on human mesenchymal stem cells: differential gene expression of IL1B and MAP3K8 in MAPK signaling. *Gene Expr. Patterns* 9: 381–388.
- Goddette DW, Frieden C (1986a) Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J. Biol. Chem.* 261: 15974–15980.
- Goddette DW, Frieden C (1986b) The kinetics of cytochalasin D binding to monomeric actin. *J. Biol. Chem.* 261: 15970–15973.
- Guercio A, Di Bella S, Casella S, Di Marco P, Russo C, Piccione G (2013) Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol. Int.* 37: 789–798.
- Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimple JM, Liedtke W, Chen CS (2009) Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 5: 17–26.
- Haas TA, Plow EF (1997) Development of a structural model for the cytoplasmic domain of an integrin. *Protein Eng.* 10: 1395–1405.
- Hagmann S, Moradi B, Frank S, Dreher T, Kämmerer PW, Richter W, Gotterbarm T (2013) Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskelet. Disord.* 14: 223.
- Haudenschild AK, Hsieh AH, Kapila S, Lotz JC (2009) Pressure and distortion regulate human mesenchymal stem cell gene expression. *Ann. Biomed. Eng.* 37: 492–502.
- Higgins PJ, Ryan MP (1992) Identification of the 52 kDa cytoskeletal-like protein of cytochalasin D-stimulated normal rat kidney (NRK/CD) cells as substrate-associated glycoprotein p52 [plasminogen-activator inhibitor type-1 (PAI-1)]. Expression of p52 (PAI-1) in NRK/CD cells is regulated at the level of mRNA abundance. *Biochem. J.* 284: 433–439.
- Holzinger A (2009) Jasplakinolide: an actin-specific reagent that promotes actin polymerization. *Methods Mol. Biol.* 586: 71–87.
- Hornberger TA, Armstrong DD, Koh TJ, Burkholder TJ, Esser KA (2005) Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: 185–94.
- Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K (1986) Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin - a transmembrane linkage. *Nature* 320: 531–533.
- Hsu Y, Fuchs E (2012) A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 103–114.
- Hubchak SC (2003) Cytoskeletal Rearrangement and Signal Transduction in TGF- 1-Stimulated Mesangial Cell Collagen Accumulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 1969–1980.

- Huisman E, Lu A, McCormack RG, Scott A (2014) Enhanced collagen type I synthesis by human tenocytes subjected to periodic in vitro mechanical stimulation. *BMC Musculoskelet. Disord.* 15: 386.
- Huveneers S, Truong H, Fässler R, Sonnenberg A, Danen EHJ (2008) Binding of soluble fibronectin to integrin  $\alpha 5 \beta 1$  - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J. Cell. Sci.* 121: 2452–2462.
- Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS (2005) Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 171: 1023–1034.
- Jiang B, Liu L (2008) AKT signaling in regulating angiogenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* 8: 19–26.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912.
- Kasten A, Müller P, Bulnheim U, Groll J, Bruellhoff K, Beck U, Steinhoff G, Möller M, Rychly J (2010) Mechanical integrin stress and magnetic forces induce biological responses in mesenchymal stem cells which depend on environmental factors. *J. Cell. Biochem.* 111: 1586–1597.
- Kawamura S, Miyamoto S, Brown JH (2003) Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J. Biol. Chem.* 278: 31111–31117.
- Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE (2013) MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells Int.* 2013: 732742.
- Kerkis I, Caplan AI (2012) Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng. Part B Rev.* 18: 129–138.
- Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA (2000) Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin. *J. Pathol.* 156: 1345–1362.
- Kim S, Choi YR, Park MS, Shin JW, Park KD, Lee JW (2007) ERK 1/2 activation in enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells in poly (lactic-glycolic acid) by cyclic hydrostatic pressure. *J. Biomed. Mater. Res.* 80: 826–836.
- Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P (1999) Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* 18: 2459–2471.
- Kolahi KS, Mofrad MRK (2010) Mechanotransduction: a major regulator of homeostasis and development. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2: 625–639.
- Kook S, Hwang J, Park J, Kim E, Heo J, Jeon Y, Lee J (2009) Mechanical force induces type I collagen expression in human periodontal ligament fibroblasts through activation of ERK/JNK and AP-1. *J. Cell. Biochem.* 106: 1060–1067.
- Kook S, Jang Y, Lee J (2011) Involvement of JNK-AP-1 and ERK-NF- $\kappa$ B signaling in tension-stimulated expression of type I collagen and MMP-1 in human periodontal ligament fibroblasts. *J. Appl. Physiol.* 111: 1575–1583.
- Kühn K (1974) Struktur und Biochemie des Kollagens. *Chem. unserer Zeit* 8: 97–103.
- Lai KV, Pawson T (2000) The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev.* 14: 1132–1145.

- Lázaro-Diéguez F, Aguado C, Mato E, Sánchez-Ruiz Y, Esteban I, Alberch J, Knecht E, Egea G (2008) Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. *J. Cell. Sci.* 121: 1415–1425.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 31: 890–896.
- Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC (1995) Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3: 1333–1340.
- Legate KR, Wickström SA, Fässler R (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23: 397–418.
- Li B, Moshfegh C, Lin Z, Albuschies J, Vogel V (2013) Mesenchymal stem cells exploit extracellular matrix as mechanotransducer. *Sci. Rep.* 3: 2425.
- Li S, Shi R, Wang Q, Cai J, Zhang S (2012) Nanostructure and  $\beta$ 1-integrin distribution analysis of pig's spermatogonial stem cell by atomic force microscopy. *Gene* 495: 189–193.
- Lim JY, Taylor AF, Li Z, Vogler EA, Donahue HJ (2005) Integrin expression and osteopontin regulation in human fetal osteoblastic cells mediated by substratum surface characteristics. *Tissue Eng.* 11: 19–29.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) Intermediate Filaments - Molecular Cell Biology - NCBI Bookshelf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21560/> (12/03/2014).
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 4: 415–428.
- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 176: 57–66.
- Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 849–854.
- Mizuno Y, Makioka A, Kawazu S, Kano S, Kawai S, Akaki M, Aikawa M, Ohtomo H (2002) Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* 88: 844–848.
- Müller P, Langenbach A, Kaminski A, Rychly J (2013) Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 8: e71283.
- Nair UB, Joel PB, Wan Q, Lowey S, Rould MA, Trybus KM (2008) Crystal structures of monomeric actin bound to cytochalasin D. *J. Mol. Biol.* 384: 848–864.
- Naumann A, Dennis J, Staudenmaier R, Rotter N, Aigner J, Ziegelaar B, Happ T, Rasp G, Caplan AI (2002) Adulte mesenchymale Stammzellen-neue Möglichkeiten der Gewebezüchtung für die plastisch-rekonstruktive Chirurgie. *Laryngo-Rhino-Otologie* 81: 521–527.
- Oh ES, Gu H, Saxton TM, Timms JF, Hausdorff S, Frevert EU, Kahn BB, Pawson T, Neel BG, Thomas SM (1999) Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3205–3215.

- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 10344–10349.
- Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S (1999) Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 84: 1127–1136.
- Pantaloni D, Boujemaa R, Didry D, Gounon P, Carlier MF (2000) The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat. Cell Biol.* 2: 385–391.
- Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF (2001) Mechanism of Actin-Based Motility. *Science* 292: 1502-1506.
- Parsons JT (2003) Focal adhesion kinase; The first ten years. *J. Cell Sci.* 116: 1409–1416.
- Pelaez D, Arita N, Cheung HS (2012) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) dictates osteogenic and/or chondrogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells under dynamic compression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417: 1286–1291.
- Pieri L, Urbani S, Mazzanti B, Dal Pozzo S, Santosuosso M, Saccardi R, Bosi A, Fausone-Pellegrini MS, Vannucchi MG (2011) Human mesenchymal stromal cells preserve their stem features better when cultured in the Dulbecco's modified Eagle medium. *Cytotherapy* 13: 539–548.
- Pittenger M, Vanguri P, Simonetti D, Young R (2002) Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2: 309–320.
- Pittenger MF (2008) Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol. Biol.* 449: 27–44.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
- Pizzo AM, Kokini K, Vaughn LC, Waisner BZ, Voytik-Harbin SL (2005) Extracellular matrix (ECM) microstructural composition regulates local cell-ECM biomechanics and fundamental fibroblast behavior: a multidimensional perspective. *J. Appl. Physiol.* 98: 1909–1921.
- Pommerenke H, Schmidt C, Dürr F, Nebe B, Lüthen F, Müller P, Rychly J (2002) The mode of mechanical integrin stressing controls intracellular signaling in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 17: 603–611.
- Pommerenke H, Schreiber E, Dürr F, Nebe B, Hahnel C, Möller W, Rychly J (1996) Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response. *Eur. J. Cell Biol.* 70: 157–64.
- Posey SC, Bierer BE (1999) Actin stabilization by jasplakinolide enhances apoptosis induced by cytokine deprivation. *J. Biol. Chem.* 274: 4259–4265.
- Prowse AB, Chong F, Gray PP, Munro TP (2011) Stem cell integrins: implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem Cell Res.* 6: 1-12.
- Rennebaum S, Caflisch A (2012) Inhibition of interdomain motion in g-actin by the natural product latrunculin: a molecular dynamics study. *Proteins* 80: 1998–2008.

- Resh MD (1998) Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 1159–1162.
- Rhee ST, El-Bassiony L, Buchman SR (2006) Extracellular signal-related kinase and bone morphogenetic protein expression during distraction osteogenesis of the mandible: in vivo evidence of a mechanotransduction mechanism for differentiation and osteogenesis by mesenchymal precursor cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 117: 2243–2249.
- Robinson SJ, Morinaka BI, Amagata T, Tenney K, Bray WM, Gassner NC, Lokey RS, Crews P (2010) New structures and bioactivity properties of jasplakinolide (jaspamide) analogues from marine sponges. *J. Med. Chem.* 53: 1651–1661.
- Rychly J, Pommerenke H, Dürr F, Schreiber E, Nebe B (1998) Analysis of spatial distributions of cellular molecules during mechanical stressing of cell surface receptors using confocal microscopy. *Cell Biol. Int.* 22: 7–12.
- Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441: 1075–1079.
- Schmidt C, Pommerenke H, Dürr F, Nebe B, Rychly J (1998) Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J. Biol. Chem.* 273: 5081–5085.
- Schüler H (2001) ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin. *Biochim. Biophys. Acta* 1549: 137–147.
- Scott VR, Boehme R, Matthews TR (1988) New class of antifungal agents: jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1154–1157.
- Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJA, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, Markman B, Rodriguez O, Guzman M, Rodriguez S, Gili M, Russillo M, Parra JL, Singh S, Arribas J, Rosen N, Baselga J (2011) PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene* 30: 2547–2557.
- Shinji H, Akagawa KS, Yoshida T (1993) Cytochalasin D inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 54: 336–342.
- Singer NG, Caplan AI (2011) Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* 6: 457–478.
- Solomon F (1977) Binding sites for calcium on tubulin. *Biochemistry* 16: 358–363.
- Solowska J, Edelman JM, Albelda SM, Buck CA (1991) Cytoplasmic and transmembrane domains of integrin beta 1 and beta 3 subunits are functionally interchangeable. *J. Cell Biol.* 114: 1079–1088.
- Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y (1989) Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil. Cytoskeleton* 13: 127–144.
- Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A (1983) Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219: 493–495.
- Steward AJ, Wagner DR, Kelly DJ (2014) Exploring the roles of integrin binding and cytoskeletal reorganization during mesenchymal stem cell mechanotransduction in soft and stiff hydrogels subjected to dynamic compression. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 38: 174–82.

- Summers K, Kirschner MW (1979) Characteristics of the polar assembly and disassembly of microtubules observed in vitro by darkfield light microscopy. *J. Cell Biol.* 83: 205–217.
- Tanaka N, Ikeda Y, Yamaguchi T, Furukawa H, Mitomi H, Nakagawa T, Tohma S, Fukui N (2013)  $\alpha 5\beta 1$  integrin induces the expression of noncartilaginous procollagen gene expression in articular chondrocytes cultured in monolayers. *Arthritis Res. Ther.* 15: 127.
- Thoumine O, Nerem RM, Girard PR (1995) Oscillatory shear stress and hydrostatic pressure modulate cell-matrix attachment proteins in cultured endothelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31: 45–54.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105: 93–98.
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75: 389–397.
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E (2004) Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303: 359–363.
- Uitto VJ, Larjava H (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: an overview with special emphasis on periodontal tissues. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2: 323–354.
- Ujihara Y, Miyazaki H, Wada S (2008) Morphological study of fibroblasts treated with cytochalasin D and colchicine using a confocal laser scanning microscopy. *J. Physiol. Sci.* 58: 499–506.
- Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Kuriyan J (1998) Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279: 1048–1052.
- Volkman N, Amann KJ, Stoilova-McPhie S, Egile C, Winter DC, Hazelwood L, Heuser JE, Li R, Pollard TD, Hanein D (2001) Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* 293: 2456–2459.
- Volkman N, DeRosier D, Matsudaira P, Hanein D (2001) An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function. *J. Cell Biol.* 153: 947–956.
- Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC, Elson EL (2001) Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell. Sci.* 114: 1025–1036.
- Wang JH, Thampatty BP (2008) Mechanobiology of adult and stem cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 271: 301–346.
- Wang L, Li Y, Chen J, Gautam SC, Zhang Z, Lu M, Chopp M (2002) Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp. Hematol.* 30: 831–836.
- Wang L, Yang X, Wang W (2013) [Isolation and identification of human endometrial stromal stem cells]. *Zhejiang Da Xue* 42: 311–318.
- Wang L, Zhang Y, Wang J, Wu Y, Xiang Y, Xie C, Jia B, Harrington J, McNiece IK (2005) [Biological characteristics of mesenchymal stem cells in human umbilical cord blood and their supporting capacities in ex vivo expansion of CD34+ hematopoietic stem cells]. *Zhonghua Xue Ye* 26: 65–68.

- Wang T, Zhang X, Li JJ (2002) The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1509–1520.
- Wang Y, Chang J, Chen K, Li S, Li JY, Wu C, Chien S (2007) Selective adapter recruitment and differential signaling networks by VEGF vs. shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 8875–8879.
- Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287: 1427–1430.
- Watts KR, Morinaka BI, Amagata T, Robinson SJ, Tenney K, Bray WM, Gassner NC, Lokey RS, Media J, Valeriote FA, Crews P (2011) Biostructural features of additional jasplakinolide (jaspamide) analogues. *J. Nat. Prod.* 74: 341–351.
- Welch MD, Mullins RD (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 247–288.
- Weng Z, Thomas SM, Rickles RJ, Taylor JA, Brauer AW, Seidel-Dugan C, Michael WM, Dreyfuss G, Brugge JS (1994) Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins; Implications for a function of SH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4509–4521.
- Wheeler DL, Iida M, Dunn EF (2009) The role of Src in solid tumors. *Oncologist* 14: 667–678.
- Wiche G (1998) Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell. Sci.* 111: 2477–2486.
- Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG (1999) Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am. Surg.* 65: 22–26.
- Winer JP, Oake S, Janmey PA (2009) Non-linear elasticity of extracellular matrices enables contractile cells to communicate local position and orientation. *PLoS ONE* 4: e6382.
- Yang H, Yu C, Yang Z (2012) N-acetylglucosaminyltransferase V negatively regulates integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -mediated monocyte adhesion and transmigration through vascular endothelium. *Int. J. Oncol.* 41: 589–598.
- Yarmola EG, Somasundaram T, Boring TA, Spector I, Bubb MR (2000) Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J. Biol. Chem.* 275: 28120–28127.
- Yi T, Lee D, Jeon M, Kwon SW, Song SU (2012) Gene expression profile reveals that STAT2 is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Gene* 497: 131–139.
- Yim EK, Sheetz MP (2012) Force-dependent cell signaling in stem cell differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* 3: 41.
- Zajac AL, Discher DE (2008) Cell differentiation through tissue elasticity-coupled, myosin-driven remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 609–615.
- Zan L, Wu H, Jiang J, Zhao S, Song Y, Teng G, Li H, Jia Y, Zhou M, Zhang X, Qi J, Wang J (2011) Temporal profile of Src, SSeCKS, and angiogenic factors after focal cerebral ischemia: correlations with angiogenesis and cerebral edema. *Neurochem. Int.* 58: 872–879.
- Zeng G, Lai K, Li J, Zou Y, Huang H, Liang J, Tang X, Wei J, Zhang P (2013) A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells. *Organogenesis* 9: 287–295.

## Literaturverzeichnis

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA de, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13: 4279–4295.